

VISIT...

LANZAROTE
Caliente.COM



Академические чтения

Г. П. ГЕОРГИЕВ

**ГЕНЫ
ВЫСШИХ
ОРГАНИЗМОВ
И ИХ
ЭКСПРЕССИЯ**

„Наука“

ОГЛАВЛЕНИЕ



Академические чтения

Г. П. ГЕОРГИЕВ

ГЕНЫ ВЫСШИХ ОРГАНИЗМОВ И ИХ ЭКСПРЕССИЯ



МОСКВА «НАУКА»

1989

ББК 28 04
Г 36
УДК 577 21

Редколлегия

академик Г К Скрыбин (главный редактор),
член корреспондент А С Хохлов
(зам главного редактора),
академик А С Боровик-Романов, академик Ю В Гуляев,
академик Н Н Моисеев, академик И В Петрянов-Соколов,
академик А А Баев, академик В Е Соколов,
академик Б С Соколов,
академик Г А Авсюк, академик Ю А Бромлей,
Л И Хренникова (ответственный секретарь)

Рецензенты

академик АМН СССР И Б Збарский,
академик А Д Мирзабеков

Георгиев Г. П.

Г 36 Гены высших организмов и их экспрессия. —
М.: Наука, 1989. — 255 с., ил — (Серия
«Академические чтения»)
ISBN 5—02—003968—3

В монографии излагаются вопросы структурной
организации генетического аппарата эукариот, структуры
хроматина, регуляции экспрессии генов, организации
ядерных рибонуклеопротеидов, процессинга РНК

Рассчитана на биологов широкого профиля

Г 2001010000—249
054(02)—89 63—88 НПЛ

ББК 28.04

ISBN 5—02—003968—3

© Издательство «Наука», 1989

Посвящаю этот труд
светлой памяти моего отца
ПАВЛА КОНСТАНТИНОВИЧА ГЕОРГИЕВА
выдающегося человека трагически
погибшего в годы сталинских злодеяний

ПРЕДИСЛОВИЕ

Серия монографий «Академические чтения» задумана как расширенное изложение докладов, сделанных авторами на заседаниях президиума АН СССР. В настоящей книге рассматриваются вопросы, затронутые в двух моих выступлениях, посвященных организации и функционированию генетического аппарата высших организмов.

Эти доклады основаны на результатах работ, выполненных в лаборатории автора. Поэтому в монографии прежде всего освещаются те разделы проблемы, в разработке которых наша лаборатория принимала активное участие и в ряде случаев выполнила ключевые исследования. При этом работы, проведенные в лаборатории, излагаются более подробно.

В результате создается определенная асимметричность в изложении разных аспектов проблемы. Однако и те разделы, в разработке которых ни наша, ни другие советские лаборатории не принимали участия, тоже излагаются, хотя и более кратко.

В книге рассмотрены вопросы молекулярной биологии эукариотического гена. Естественно, за рамки книги выпадают проблемы частных областей молекулярной биологии гена, такие, как молекулярная онкология, молекулярная иммунология и др.

Следует отметить, что в последние годы на Западе появился ряд руководств по затронутым в монографии вопросам. Сюда относятся «Молекулярная биология клет-

ки» Б. Альбертса, Д. Брея, Дж. Льюиса и др. (М., 1986), «Гены» Б. Льюина (М., 1987) и «Молекулярная биология гена» Дж. Уотсона (М., 1978). В перечисленных книгах, с одной стороны, довольно подробно излагаются все основные вопросы, в том числе и те, которые опущены в настоящей монографии. С другой стороны, в них подчас дается не вполне точное изложение, где результаты, полученные впервые советскими авторами, преподносятся как достижения американской науки. При этом цитируются гораздо более поздние работы американских авторов, даже если они просто воспроизводят ранее полученные в СССР результаты. Настоящая книга вносит соответствующие коррективы.

В тексте и оглавлении значком (1*) обозначены разделы, существенный вклад в разработку которых был внесен лабораторией автора, а значком (2*) — другими советскими лабораториями. В списке литературы широко представлены оригинальные работы советских исследователей, которым до их появления не было аналогов в западной литературе. Цитирование зарубежных работ носит выборочный характер. Дополнительные ссылки читатель легко может найти в вышеупомянутых книгах и в оригинальных работах.

Кроме исследований по структуре и функционированию генетического аппарата высших организмов, в лаборатории автора и в ряде других советских лабораторий в последние годы весьма активно изучались вопросы, связанные со структурой и функцией мобильных генетических элементов. На этих направлениях получены оригинальные результаты, которые были отражены в двух других докладах автора на президиуме АН СССР.

В заключение считаю своим приятным долгом выразить признательность лицам, прочитавшим отдельные разделы книги и сделавшим ценные замечания: А. Д. Мирзабекову, С. В. Разину, С. А. Лимборской, В. Л. Бухману, Г. Н. Ениколопову, Д. А. Крамерову и др., а также И. Н. Стрижак за помощь в подготовке рукописи.

Глава первая

ВВЕДЕНИЕ

В МОЛЕКУЛЯРНУЮ БИОЛОГИЮ ГЕНА

1.1. Начало молекулярной биологии гена

Литература: [1—10]

В конце 60-х годов XIX в., т. е. немногим более 100 лет назад, произошли два важных научных события, положивших начало современной биологической науке. Чехословацкий монах-естествоиспытатель Грегор Мендель открыл гены, а швейцарский химик Фридрих Мишер открыл ДНК.

Однако потребовалось еще около трех четвертей века, чтобы понять, что гены — это ДНК. В конце 1930-х—начале 1940-х годов на основании цитологических и цитохимических опытов Т. Касперссон в Швеции, Ж. Браше в Бельгии и Б. В. Кедровский в нашей стране сделали предположение о прямом участии нуклеиновых кислот в биосинтезе белка. К сожалению, начавшаяся война помешала публикации работ Б. В. Кедровского, и поэтому его вклад обычно не вспоминается. Цитологические исследования не давали, однако, однозначного доказательства генетической роли нуклеиновых кислот.

В 1944 г. американские ученые О. Эйвери и М. Мак-Картни в прямых опытах показали, что определенный генетический признак (форму колоний) можно перенести от одной линии бактерий к другой, обработав последнюю чистой ДНК, выделенной из первой линии. Отсюда уже однозначно следовал вывод, что гены — это ДНК.

Наконец, в 1953 г. произошло событие, непосредственно положившее начало молекулярной биологии. Американец

Джеймс Уотсон и англичанин Фрэнсис Крик в Кембридже расшифровали структуру ДНК — двойную спираль. Их работа базировалась на данных М. Уилкинса и Р. Франклин (Великобритания) по рентгеноструктурному анализу ДНК и на данных Э. Чаргаффа (США) о нуклеотидном составе ДНК. Драматическая история открытия структуры ДНК прекрасно описана в книге Дж. Уотсона «Двойная спираль».

Это открытие сразу прояснило механизм удвоения, «репликации», генов через образование комплементарных пар G—C и A—T (G — дезоксигуаниловая, C — дезоксцитидиловая, A — дезоксиадениловая, T — тимидиловая кислоты). Стал ясен молекулярный механизм наследования. Поэтому 1953 г. считают обычно годом рождения молекулярной биологии. Примерно в это же время сформировались идеи о том, что перенос генетической информации от ДНК к белку идет через РНК, т. е. в клетке существует информационная цепочка ДНК→РНК→белок. Эти представления были подкреплены выделением ферментов синтеза ДНК по матрице ДНК и синтеза РНК по матрице ДНК, т. е. ДНК-зависимых ДНК-полимеразы и РНК-полимеразы.

Одновременно в начале 50-х годов нашего столетия было твердо установлено, что синтез белка происходит в рибосомных частицах, содержащих РНК и белок. Предполагали, что рибосомная РНК участвует и в передаче информации от ДНК к белку. Однако в конце 1950-х годов А. Н. Белозерский и А. С. Спирин (Институт биохимии им. А. Н. Баха АН СССР) показали, что в то время, как нуклеотидный состав ДНК у разных бактерий варьирует в широких пределах, нуклеотидный состав РНК является весьма монотонным. Наблюдалась лишь небольшая корреляция между нуклеотидным составом ДНК и РНК. Стало очевидным, что рибосомная РНК не может считываться с разных участков ДНК, т. е. она, вероятно, не несет информационной нагрузки. Возникло представление, что

такую роль может выполнять особая фракция РНК, составляющая малую долю от всей РНК клетки.

Тогда же было обнаружено, что РНК, синтезирующаяся в клетках при заражении их бактериофагом, по своему нуклеотидному составу резко отличается от общей, т. е. рибосомной РНК бактерии, и соответствует ДНК бактериофага. Эта РНК была названа ДНК-подобной. Предполагалось, что она участвует в переносе генетической информации от ДНК к РНК.

В 1960—1961 гг. Ф. Жакоб и Ж. Моно (Франция) на основании генетического изучения индуцированного синтеза ферментов у микроорганизмов сделали ряд важных выводов. Они доказали, что передача информации от ДНК к белку осуществляется короткоживущим соединением, очевидно, особой РНК, которую они называли мРНК (messenger RNA). В 1961 г. две группы исследователей подтвердили предсказание о существовании мРНК и изолировали ее из бактериальных клеток. Оказалось, что мРНК составляет лишь несколько процентов от всей РНК и что она в основной своей массе весьма нестабильна, распадаясь после того, как с ее участием произойдет несколько циклов белкового синтеза.

Открытие мРНК совпало во времени с первыми работами по расшифровке генетического кода, которая была завершена в начале 60-х годов.

Таким образом, сформировалась молекулярная биология, и прежде всего молекулярная биология гена.

Большинство работ на этом первом этапе было выполнено на простых системах, бактериях и их вирусах, бактериофагах, т. е. на прокариотах — организмах, лишенных клеточного ядра, в отличие от ядерных организмов — эукариот. Эукариотические организмы, животные и растения, не были популярны как объект, поскольку они устроены гораздо сложнее и имеют намного больший по величине генетический аппарат. Поэтому ожидалось, что при работе с ними легко можно получить ошибочные результаты

В связи с этим лишь сравнительно небольшое число групп начали в конце 1950-х годов работы по изучению процессов передачи генетической информации у эукариотических организмов, стараясь, в частности, найти специфические для них особенности. Одной из них была наша группа в лаборатории И. Б. Збарского (Институт морфологии животных им. А. Н. Северцова АН СССР), позднее (в 1963 г.) перешедшая по приглашению В. А. Энгельгардта в виде новой лаборатории биосинтеза нуклеиновых кислот в Институт молекулярной биологии АН СССР.

1.2^{1*}. Открытие ядерной дРНК в эукариотических клетках

Роль клеточного ядра в синтезе РНК. В конце 1950-х годов в литературе шли жаркие споры о том, где происходит синтез РНК — в ядре или цитоплазме. Постепенно складывалось мнение, что синтез РНК практически полностью происходит в ядре. Это хорошо укладывалось в схему ДНК→РНК→белок, поскольку ядерная локализация, по крайней мере основной части ДНК, не вызывала сомнений. В пользу того, что синтез РНК идет в ядре, возможно на матрице ДНК, прежде всего говорили результаты опытов по включению радиоактивных предшественников в РНК ядра и цитоплазмы, которые были выполнены во многих лабораториях мира. Клетки инкубировали в течение короткого времени с радиоактивным предшественником, например уридином- $[^3\text{H}]$, и затем смотрели на распределение включившейся метки между ядром и цитоплазмой с помощью так называемой автордиографии. Срезы клеток покрывали фотоэмульсией и после выдержки и проявления видели, что при короткой инкубации клеток с меченым предшественником практически вся меченая РНК находится в ядре и лишь позднее начинает поступать в цитоплазму.

В то время в цитоплазме клеток выявляли два основ-

ных типа РНК. Это были высокомолекулярная, в основном рибосомная РНК (рРНК), состоящая из двух компонентов, и низкомолекулярная, в основном транспортная РНК (тРНК). Они хорошо разделялись при ультрацентрифугировании. Их скорости седиментации, описываемые так называемыми коэффициентами седиментации ($S_{20, w}$), составляли 28S и 18S для рРНК и 4S для низкомолекулярной РНК. Это соответствовало длине ~ 5000 , ~ 2000 и 70—100 нуклеотидов соответственно.

Нуклеотидный состав цитоплазматической РНК определялся доминирующим компонентом, т. е. рРНК. Он отличался высоким содержанием гуаниловой (G) и цитидиловой (C) кислот. Отношение $G+C/A$ (адениловая кислота) $+U$ (уридиловая кислота) составляло $\sim 1,6$. В то же самое время в ДНК клеток животных преобладали A и T; коэффициент специфичности $G+C/A+T$ составлял около 0,7.

Было неясно, каким образом на матрице ДНК синтезируется РНК совсем другого нуклеотидного состава, т. е. возникало то же самое противоречие, что и при сравнении нуклеотидного состава ДНК и РНК бактерий, только еще более ярко выраженное.

Чтобы решить этот вопрос, предпринимались попытки изучить природу ядерной РНК, но это затруднялось отсутствием в то время методов выделения ядер, при которых РНК не деградировала бы.

Выделение недеградированной ядерной РНК^{1*} [11—13]. В 1960 г. мы с В. Л. Мантьевой искали пути для выделения ядерной РНК в более или менее нативном состоянии, чтобы изучить ее свойства и выяснить природу. В это время широкое применение приобрел метод выделения нуклеиновых кислот с помощью обработки фенолом. После обработки клеток смесью фенола и воды (или солевого раствора) и разделения фаз центрифугированием РНК переходила в водный слой, а большая часть белков растворялась в феноле (рис. 1). В определенных условиях,

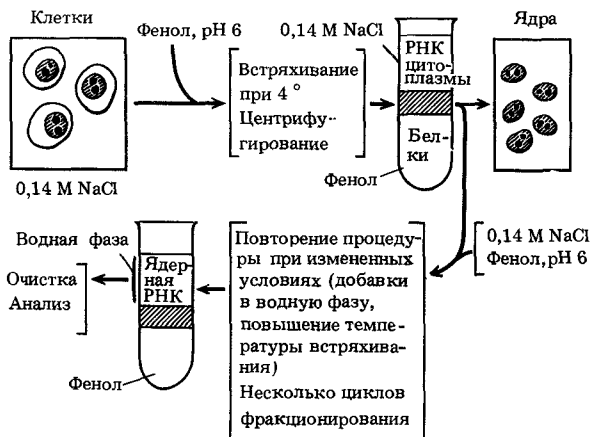


Рис 1 Принципиальная схема метода фенольного фракционирования ядерной РНК и выделения в чистом виде дРНК (гяРНК)

Схемы фракционирования, использованные при открытии дРНК (1961 г.) 0,14 М NaCl/фенол, pH 6, 0° (3 раза), 5 % *n*-аминосалицилат/фенол, pH 6, 0° — дРНК, 0,14 М NaCl/фенол, pH 6, 60° — рРНК, при создании метода термического фенольного фракционирования (1962 г.) 0,14 М NaCl/фенол, pH 6, 0° (3 раза), 40° — рРНК, 55° — рРНК+дРНК, 65° — дРНК, при создании конечного варианта этого метода (1967 г.) 0,14 М NaCl/фенол, pH 6, 0° (3 раза), 40° — рРНК, 55° — рРНК+дРНК, 0,14 М NaCl+додецилсульфат/фенол, pH 6, 63° — дРНК, 85° — дРНК (по результатам, полученным В. Л. Мантысов, В. Я. Арионов и соавт.)

если добавлять в водный раствор детергенты, то в него переходит и ДНК. Фенол не только сразу удалял значительную часть белков, но и ингибировал нуклеазы клетки, и это помогало получать неповрежденные нуклеиновые кислоты. Мы использовали этот метод для выделения РНК и ДНК.

После встряхивания клеток, суспендированных в 0,14 М NaCl с фенолом (pH 6), на холоду и последующего центрифугирования на границе между водной (верхней) и феноль-

ной фазами образовывался слой нерастворимого материала, который содержал всю ДНК и сравнительно небольшую часть РНК и белков клетки. При этом основная часть клеточной РНК присутствовала в водной фазе, а белков — в фенольной. Из промежуточного слоя были взяты мазки, окрашены, и при их микроскопии неожиданно оказалось, что нерастворимый материал, или «интерфаза», содержит сохранившие свою форму клеточные ядра. В них были хорошо различимы даже ядрышки (см. рис. 1). Мы предположили, что «фенольные ядра» окажутся хорошим объектом для выделения из них ядерной РНК, так как клетки сразу обрабатывались фенолом, ингибирующим нуклеазы. После ряда неудачных попыток извлечь РНК из «фенольных ядер» я использовал обработку в той же системе 0,14 М NaCl — фенол (рН 6), но при повышенной температуре (65°). При этом в водную фазу перешла значительная часть РНК «фенольных ядер», которая затем была очищена путем ряда переосаждений, после чего начались опыты по ее характеристике.

Во-первых, было проведено исследование размеров полученной РНК с помощью аналитического ультрацентрифугирования в лаборатории А. С. Спирина (Институт биохимии им. А. Н. Баха АН СССР), который был заинтересован в изучении нашей РНК, поскольку все изучавшиеся им препараты высокомолекулярных клеточных РНК эукариот всегда содержали только два компонента рРНК и никаких других видимых фракций РНК. В наших препаратах ядерной РНК он надеялся увидеть что-либо необычное. Однако при ультрацентрифугировании опять выявились все те же два компонента рРНК с константами седиментации 28S и 18S. Правда, кроме них, был виден гетерогенный материал, делавший пики рРНК не очень красивыми. Однако наиболее простым объяснением его появления было предположение о частичной деградаци и агрегации РНК в ходе ее выделения.

Открытие ядерной ДРНК ^{1*} [13, 14]. Чтобы «закрыть тему» и написать статью о свойствах ядерной РНК, оставалось определить нуклеотидный состав РНК из «фенольных ядер» и доказать ее рибосомную природу. Я приготовил эту РНК в больших количествах, и В. Л. Мантьева начала определение ее нуклеотидного состава. Однако он оказался сильно отличным от состава рРНК. Отношение $G+C/A+U$ составляло 1,1—1,2, а не 1,6, как в рибосомной. Мы подумали, что это результат методической ошибки и старались подогнать результат под предполагаемый, но первоначально полученный результат упорно воспроизводился (табл. 1).

Возникло противоречие между данными по ультрацентрифугированию (2 пика рРНК) и по нуклеотидному составу (резкое его отличие от рРНК). Тогда мы вспомнили о гетерогенном материале, выявлявшемся при ультрацентрифугировании наряду с 28S и 18S пиками, и подумали, что противоречие можно объяснить, если допустить существование двух компонентов в составе ядерной РНК, а именно рРНК и другой, еще неизвестной РНК с резко отличным нуклеотидным составом и гетерогенными размерами. Размытость пиков при ультрацентрифугировании могла зависеть от присутствия этой новой РНК, а не от дегградации рРНК, как мы думали вначале.

Мы начали пробовать разные эмпирические способы фракционирования РНК «фенольных ядер». Несколько опытов не дали успеха. Наконец, в одном из опытов фенольные ядра вначале обработали смесью 5 %-ного *n*-аминсалицилата фенола, а затем, после центрифугирования, материал интерфазы 0,14 М NaCl — фенолом при 65°. При этом около половины РНК перешло вместе с ДНК в водную фазу во время первой экстракции, а другая часть — во время второй (см. табл. 1). Нуклеотидный состав второй фракции РНК оказался очень похож на рРНК ($G+C/A+U \sim 1,5$), а у первой он резко отличался. Отношение $G+C/A+U$ составляло $\sim 0,8$ т. е. было близко к такому для ДНК (0,7).

Таблица 1

Нуклеотидный состав фракций РНК асцитного рака Эрлиха, полученных с помощью фенольного фракционирования (по результатам, полученным В. Л. Мانتьевой, О. П. Самариной и др.)

Фракция РНК	Нуклеотидный состав тотальной РНК				
	A	U	G	C	G+C/A+U

Первые опыты					
Тотальная ядерная	22,0	24,9	26,7	26,4	1,13
Фракция 1	24,9	27,5	23,7	23,9	0,91
» 2	19,4	22,4	30,2	28,2	1,40

Термическое фракционирование					
Фракция 0°	19,3	19,6	31,9	29,1	1,57
» 40°	17,9	21,8	30,7	29,6	1,52
» 55°	21,3	23,7	28,0	26,7	1,20
» 63°	29,1	24,6	23,3	23,1	0,86
» 85°	27,0	28,7	24,3	20,1	0,80

Фракция РНК	Нуклеотидный состав новообразованной РНК				
	A	U	G	C	G+C/A+U

Термическое фракционирование					
Фракция 0°	—	—	—	—	—
» 40°	14,5	21,7	30,6	33,2	1,77
» 55°	17,6	25,2	28,2	29,0	1,33
» 63°	27,7	24,7	21,1	23,6	0,81
» 85°	28,4	28,1	21,5	21,9	0,77

Сразу стало ясно, что мы открыли новый тип РНК, а именно РНК, по нуклеотидному составу похожую на ДНК клетки. Мы называли ее РНК AU-типа, а позднее использовали термин дРНК (ДНК-подобная РНК). Повторив этот опыт несколько раз, мы убедились в правильности заключения. Таким образом, как это часто бывает, откры-

тие явилось следствием противоречия между ожидаемым тривиальным результатом и истинным ответом, полученным в эксперименте. Важно не пропускать такие чреватые открытиями ситуации, а искать другие объяснения и ставить опыты, позволяющие их проверить.

Шла весна 1961 г. Мы стали думать о природе РНК АУ-типа, а также о публикации полученных данных. В это время стали появляться первые слухи о выявлении мРНК в клетках бактерий. Естественно было предположить, что и мы обнаружили мРНК, или информационную РНК животных клеток. Станным было лишь ее очень высокое содержание — около $\frac{1}{3}$ всей РНК «фенольных ядер».

Первые сообщения о существовании РНК АУ-типа мы опубликовали в работах [13, 14]. Данные об РНК АУ-типа были доложены летом 1961 г. на V Международном биохимическом конгрессе в Москве (секционное сообщение), но на фоне сообщений об открытии генетического кода они прошли незамеченными. Ими заинтересовался лишь А. Мирский (США). Хотя в его собственном докладе ничего похожего не было, но весной 1962 г. он и его сотрудники сообщили о сходных с нашими результатах. Был использован другой метод фракционирования, который в отличие от нашего давал полностью деградированную РНК (4-6S). Дальнейшего развития его работа не имела.

Метод фенольного термического фракционирования^{1*} [16—18]. Как бы то ни было, начиная с осени 1961 г. мы с В. Л. Мантьевой начали систематическую работу по изучению ядерной АУ-РНК, или дРНК. Первый метод нам не понравился прежде всего в силу своей недостаточно хорошей воспроизводимости. Первое, что пришло в голову, — это использовать для выделения РНК из «фенольных ядер» обработку при разных температурах. Постепенно повышая температуру (с интервалами в 5°), я получал разные фракции РНК, а В. Л. Мантьева анализировала их состав. При 40 и 45° в раствор выходила чистая рРНК ($G+C/A+U \approx 1,5-1,6$), при последующей обработке при 50 и 55° —

Таблица 2.

Нуклеотидный состав фракций новообразованной РНК (G+C/A+U), полученных путем фенольного фракционирования и последующего гель-электрофореза (по результатам, полученным В. Я. Арионом и Г. Марковым)

Температурная фракция РНК	Константа седиментации						
	<18S	18S	23S	28S	32S	45S	>45S
40°	—	1,62	1,77	1,65	1,71	1,81	1,73
63°	0,73	0,81	0,87	0,83	0,83	0,80	0,85
85°	0,90	0,90	0,84	0,84	0,84	0,84	0,80

РНК со смешанным нуклеотидным составом, а при 60 и 65° — чистая дРНК ($G+C/A+U=0,7-0,8$) (см. табл. 1,2). Метод, по крайней мере на использованных типах клеток — асцитной карциноме Эрлиха мышей и печени крысы, — был простым и очень хорошо воспроизводимым. Работа была опубликована в 1962 г.

Метод фенольного термического фракционирования (далее использовались лишь три ступени: 40, 55 и 65°, а позднее еще и 85°) давал возможность не только продемонстрировать существование ядерных дРНК и рРНК, но и нарабатывать их в миллиграммовых количествах, а следовательно, сделал возможным изучение их свойств.

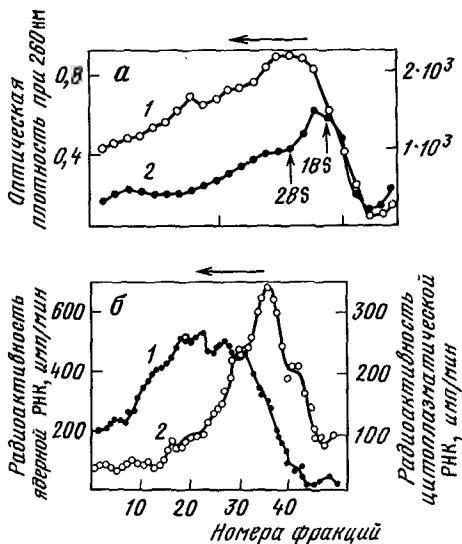
1.3^{1*}. Характеристика ядерной дРНК (гетерогенной ядерной РНК):

дРНК как предшественник мРНК цитоплазмы

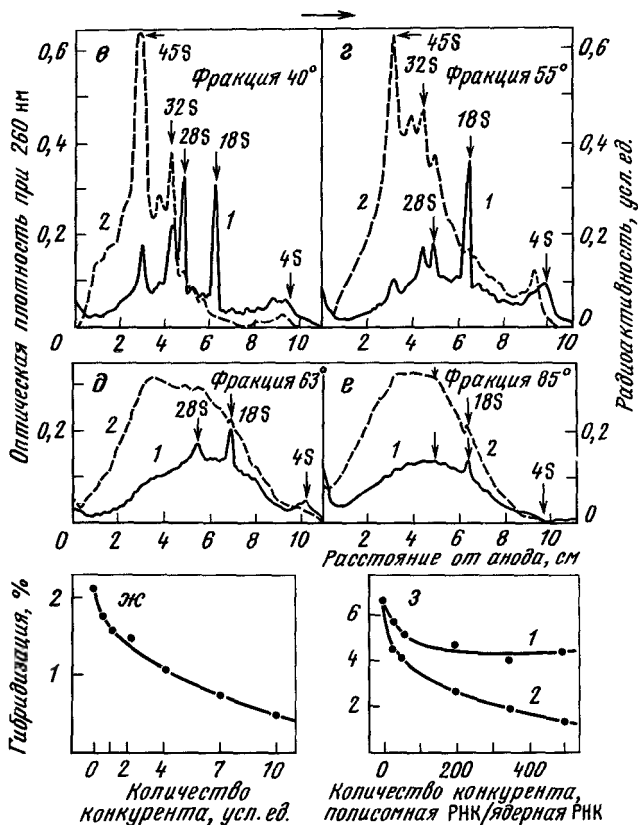
Литература: [19—26]

Характеристика полученных фракций ядерной РНК началась с определения их размеров методом ультрацентрифугирования в градиенте плотности сахарозы. Раствор РНК наслаивается в центрифужную пробирку на столбик буфера с возрастающей концентрацией сахарозы и ультра-

Рис. 2. Свойства ядерной ДНК-подобной РНК (дРНК, гяРНК, про-мРНК)



а — ультрацентрифугирование в сахарозном градиенте (16000 об/мин, 12 ч) ядерной дРНК печени крысы, полученной методом фенольного термического фракционирования. Клетки метили $[^{32}\text{P}]$ -ортофосфатом *in vivo* в течение 2,5 ч. Удельная активность тяжелых фракций выше, чем легких. 1 — радиоактивность, 2 — оптическая плотность, *б* — сравнение молекулярных масс ядерной дРНК и мРНК цитоплазмы из печени крысы. Клетки метили $[^{32}\text{P}]$ -ортофосфатом в течение 6 ч в присутствии малых доз актиномицина D, подавляющих синтез рРНК. Далее ядерную дРНК и РНК цитоплазмы ультрацентрифугировали в сахарозном градиенте. Видно, что размеры ядерной дРНК (1) намного превышают размеры цитоплазматической мРНК (2); *в* — электрофоретическое разделение фракций РНК из клеток асцитного рака Эрлиха, меченных в течение 30 мин $[^{32}\text{P}]$ -ортофосфатом. Фракции получали термическим фенольным фракционированием при 40 (в), 55 (г), 63 (д) и 85° (е). 1 — УФ-поглощение, 2 — радиоактивность. Во фракциях 40 и 55° видны радиоактивные пики предшественников рРНК (45S, 32S и др.). новообразованная ядерная дРНК (фракции 63 и 85°) гетерогенна и имеет очень высокую молекулярную массу; *ж* — гибридизация меченой мРНК полисом печени крысы с ДНК в присутствии конкурента — немеченой ядерной дРНК. Видно полное подавление связывания мРНК при добавлении ядерной дРНК; *з* — гибридизация тяжелой ядерной дРНК с ДНК в присутствии конкурента: полисомной РНК (1) или тотальной РНК (2). Тотальная РНК полностью подавляет связывание дРНК, а полисомная РНК (мРНК) менее чем на 30 % (по результатам, полученным О. П. Самариной, В. Я. Арионом, Г. Марковым и др.)



центрифугируется. Пробирка протыкается снизу, и собираются фракции, в которых определяют РНК. Градиент сахарозы не дает слоям перемешиваться. Определив место РНК в пробирке после центрифугирования и пройденный ею путь, можно рассчитать ее размеры.

Оказалось, что дРНК характеризуется сильной гете-

рогенностью, т. е. входящие в ее состав молекулы сильно различаются по своим размерам: седиментационные коэффициенты варьируют от 12S до 50—70S (рис. 2).

В этих опытах определяли также размеры и состав новообразованной РНК, т.е. РНК, которая синтезировалась за тот период времени, в течение которого клетки инкубировали с меченым предшественником РНК, например с [^{32}P]-ортофосфатом. Если за тотальной РНК можно следить по распределению материала, поглощающего ультрафиолет при длине волны 260 нм, то новообразованную РНК можно выявлять по радиоактивности.

Поскольку синтез РНК идет в ядре, ядерная РНК после короткой инкубации клеток с радиоактивным предшественником метится намного сильнее, чем РНК цитоплазмы. Нуклеотидный состав новообразованной РНК, определяемый по распределению [^{32}P] между нуклеотидами, в наших фракциях ядерной РНК был таким же, как и нуклеотидный состав общих РНК фракций. Однако по размерам новообразованная ядерная РНК превосходила общую ядерную РНК.

В случае дРНК она также была весьма гетерогенной по размерам, но при этом сдвинута в тяжелую сторону (см. рис. 2). Если инкубацию клеток с меченым предшественником вели долго (несколько часов), размеры новообразованной и тотальной РНК совпадали. Можно было предположить, что в ядрах очень длинные цепи новообразованной дРНК подвергаются далее расщеплению и укорачиваются.

При исследовании дРНК перед нами сразу возник вопрос, в какой связи ядерная дРНК находится с мРНК в цитоплазме, которая к тому моменту еще не была изолирована. Было, однако, очевидно, что последняя тоже должна отличаться по своему составу от рРНК и быть связанной с рибосомами, т. е. транслироваться. Чтобы выявить ее, мы ввели в практику метод «актиномицинового полублока». Клетки обрабатывали актиномицином D, антибиотиком,

который, как было показано другими авторами, блокирует синтез РНК и особенно эффективно синтез рРНК. Использовались малые дозы актиномицина, подавлявшие синтез рРНК, но не влиявшие на синтез дРНК. В результате практически вся новообразованная РНК клетки представляла собою дРНК. Таким образом, можно было легко выявить дРНК в цитоплазме и определить ее размеры. Оказалось, что по размерам новообразования ядерная дРНК примерно в 5 раз превышает цитоплазматическую дРНК (см. рис. 2). На основе этих результатов была сформулирована гипотеза, согласно которой ядерная дРНК является высокомолекулярным предшественником мРНК, или про-мРНК. В ходе созревания про-мРНК в мРНК она расщепляется на более короткие цепи. Существование такого предшественника отличает клетки высших организмов от клеток бактерий. Эта концепция была впервые сформулирована в работе О. П. Самариной.

В 1964—1965 гг. начались и активные исследования ядерной дРНК в других лабораториях. Почти одновременно 4 группы в Японии, Франции и США, а также К. Г. Газарян (Институт молекулярной генетики АН СССР) вновь описали эту РНК (правда, не выделив ее в чистом виде, как было сделано у нас). Как это обычно принято у американцев, ей было присвоено новое имя — «гетерогенная ядерная РНК» (hnRNA, гяРНК). Существенным вкладом этих групп явилось доказательство того, что большая часть ядерной дРНК распадается, не покидая ядра.

Концепция о гигантской ядерной РНК как предшественнике мРНК цитоплазмы прошла длинный путь постепенного накопления доказательств, пока не получила полного подтверждения уже в эру генной инженерии. Как бы то ни было, само существование такой РНК, вопрос о том, почему вначале образуется гигантский предшественник, были непонятны и составляли один из парадоксов организации генома эукариот.

1.4. ДНК эукариот содержит повторяющиеся последовательности

Открытие повторяющихся последовательностей [27]. Примерно в те же годы начались исследования, позволившие установить другое фундаментальное отличие организации генома у высших организмов, а именно существование в нем многочисленных повторяющихся последовательностей. Эти работы были выполнены группой Р. Браттена (США). Авторы изучали процессы ренатурации и гибридизации нуклеиновых кислот.

Ранее П. Доти (США) и его сотрудники показали, что двойную спираль ДНК можно расплести или денатурировать, применяя различные воздействия (повышение температуры, изменение рН и др.). В то же время, если инкубировать денатурированную одноцепочечную ДНК при температуре ниже той, которая вызывает денатурацию, комплементарные цепи реагируют между собою, вновь образуя двойную спираль, — происходит **ренатурация** ДНК. Если к ДНК добавить комплементарную РНК, может происходить образование гибридов ДНК—РНК — гибридизация, которая в дальнейшем стала одним из мощнейших методов изучения нуклеиновых кислот, позволяя выявлять комплементарные молекулы.

Ренатурация нуклеиновых кислот идет в два этапа. На первом в результате случайных столкновений одноцепочечных молекул происходит правильное соединение двух коротких комплементарных отрезков, а затем, как у молнии, идет быстрое «схлопывание» по всей длине с образованием полной двухцепочечной молекулы. Обычно скорость реакции лимитирует ее первая стадия, или стадия нуклеации. Естественно, что чем выше концентрация ДНК и чем она однороднее, тем чаще будут сталкиваться комплементарные цепи и тем быстрее будет идти реакция. Если весь геном организма уникален и в нем нет одинаковых участков, то скорость ренатурации при прочих рав-

ных условиях будет находиться в обратной зависимости от размеров генома. Для безъядерных организмов (прокариот), как показали Бриттен и сотр., это действительно так. Логарифм произведения исходной концентрации ДНК (C_0) на время, необходимое для полуренатурации ДНК ($t_{1/2}$), прямо пропорционален размеру генома.

Однако у ядерных организмов, эукариот, как показали те же авторы, это правило нарушается. Содержание ДНК на клетку у этих организмов, размер их генома в десятки и сотни раз больше, чем у бактерий. Однако значительная часть всей ДНК, от 15 до 70 %, ренатурирует гораздо быстрее, чем остальная часть ДНК, со скоростью большей или равной таковой у бактерий. Был сделан вывод, что некоторые отрезки ДНК у эукариот многократно повторяются в геноме.

Три класса последовательностей в геноме [27]. Дальнейшие исследования позволили разделить геном на три класса последовательностей: 1) сателлитную ДНК, 2) умеренно повторяющиеся последовательности, рассеянные по геному, и 3) уникальную ДНК.

Сателлитная ДНК представлена в геноме простыми последовательностями длиной от нескольких до нескольких сот нуклеотидов, повторенными сотни тысяч, а иногда и миллионы раз и сблокированными вместе, т. е. образующими в хромосомах однородные участки. Так, у *Drosophila virilis* повторяются 7-нуклеотидные сегменты АСАААСТ, АТАААСТ или АСАААТТ, образующие три разных сателлита. Сателлитная ДНК обычно концентрируется в так называемых центромерах и теломерах. Центромеры — это участки, по которым митотические хромосомы прикрепляются к нитям веретена. Теломеры — это концевые участки хромосом. И те и другие, очевидно, не несут генетической информации, но играют структурную роль в организации хромосом и их правильном разделении при митозе. В этих процессах, вероятно, и участвуют простые последовательности сателлитной ДНК.

Умеренно повторяющиеся последовательности составляют от 10 до 50 % всего генетического аппарата у разных видов эукариот. Они рассеяны по геному, образуя отрезки длиной от нескольких сот до нескольких тысяч нуклеотидов. Сильно варьирует и степень их повторяемости. Одни семейства состоят из нескольких десятков, тогда как другие — из сотен тысяч членов. В отличие от сателлитной ДНК, которая инертна, умеренные повторы активно транскрибируются в клетке, т. е. на их матрице идет активный синтез РНК.

Остальная часть генома представлена уникальными последовательностями, т. е. отрезками ДНК, встречающимися в геноме один или небольшое число раз. Скорость ренатурации таких ДНК ниже и соответствует размерам генома.

Три класса ДНК хорошо выявляются на кривых ее ренатурации (рис.3), если откладывать на оси абсцисс логарифмы C_0t , т. е. произведения концентрации ДНК (моль Р/л) на время (с), а по оси ординат — процент ренатурированной ДНК. Например, у млекопитающих около 15 % ДНК ренатурирует в интервале C_0t от 10^{-5} до 10^{-3} (сателлитная ДНК), еще 10—20 % — в интервале C_0t от 10^{-2} до 10^1 (умеренные повторы) и остальные ~70 % (уникальная ДНК) — в интервале от 10^2 до 10^4 .

Существование большого числа повторяющихся нуклеотидных последовательностей в геноме — это вторая универсальная черта в организации генетического аппарата эукариотических организмов, отличающая их от бактерий и вирусов.

Два типа организации умеренных повторов в геноме [28, 29]. В дальнейшем Р. Бриттен и присоединившийся к нему Э. Дэвидсон более подробно изучили свойства умеренных повторов в геноме. Было выявлено два основных класса таких повторов: короткие, длиной в 100—300 пар нуклеотидов (п. н.), и длинные — несколько тысяч пар нуклеотидов (т. п. н.). У большинства видов, напри-

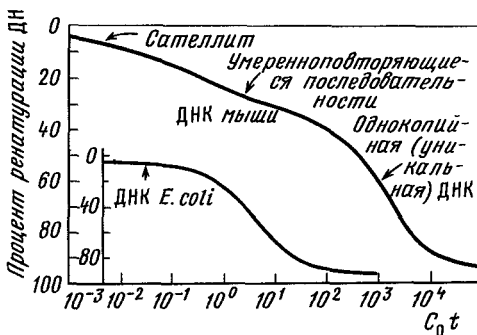


Рис. 3. Кривые ренатурации ДНК мыши и ДНК из *E. coli*

Фрагменты денатурированной ДНК размером 400 п. н. отжигали при разных величинах C_0t и определяли количество ренатурированной ДНК с помощью хроматографии на гидроксиплатите. ДНК *E. coli* денатурирует в узком интервале C_0t , будучи представлена только уникальными последовательностями, ДНК мыши распадается на несколько кинетических компонентов (по результатам, полученным Дж. Хирстом).

мер у многих земноводных и млекопитающих, преобладают короткие повторы, перемежающиеся с отрезками уникальной ДНК длиной около 1 т. п. н., тогда как у некоторых других (например, у *D. melanogaster*) короткие повторы не выявлялись, а вместо них умеренно повторяющаяся ДНК входила в состав длинных отрезков генома (несколько т. п. н.), перемежаясь с участками уникальной ДНК длиной несколько десятков т. п. н. Авторы развили представление о двух основных типах организации генома: подобному геному *Xenopus* (в основном короткие повторы) и подобному геному дрозофилы (длинные повторы).

Природа как коротких, так и длинных повторов была загадочной. Лишь небольшая часть их приходилась на повторяющиеся гены, например гены для рРНК или для гистонов. Большинство же их как будто не несло никакой генетической информации. Этот парадокс организации эукариотического генома также не был решен до внедрения методов генной инженерии.

1.5^{1*}. Концепции организации эукариотического гена

Гипотеза о гигантской про-мРНК ^{1*} [30, 31]. По мере накопления общих данных о структуре ДНК и РНК эукариотических клеток начались попытки их обобщения, и появились гипотезы, объясняющие их особенности по сравнению с ДНК и РНК прокариот.

Выше упоминалась уже концепция про-мРНК, согласно которой в ядре происходит синтез высокомолекулярного предшественника мРНК, который затем подвергается частичному разрушению в клеточном ядре, в результате чего образуется зрелая мРНК. Последняя транспортируется из ядра в цитоплазму. Про-мРНК в среднем в 5 раз длиннее зрелой мРНК.

Эта концепция была выдвинута вначале О. П. Самариной (см. выше), а затем и рядом других авторов. Она стала далее объектом ожесточенных споров, так как появились утверждения, что на самом деле вся дРНК в ядре подвергается распаду и не является предшественником мРНК. Последняя, по мнению соответствующих авторов, синтезировалась сразу, как таковая, и быстро переносилась в цитоплазму.

Дискуссии по этому вопросу заняли около 10 лет. В 1966 г. В. Я. Арион в нашей лаборатории получил первые данные, доказывающие происхождение мРНК цитоплазмы из тяжелой ядерной дРНК. Он проводил гибридизацию меченой ядерной дРНК с ДНК, добавляя в смесь в качестве конкурента мРНК цитоплазмы. Оказалось, что мРНК подавляет связывание тяжелой ядерной дРНК с ДНК примерно на 20 %. В то же время если гибридизацию вели между легкой ядерной дРНК и ДНК, то мРНК цитоплазмы подавляла гибридизацию почти полностью. В обратных опытах, когда вели гибридизацию ДНК с меченой мРНК цитоплазмы в присутствии немеченой ядерной дРНК в качестве конкурента, происходило полное подавление ре-

акции как тяжелой, так и легкой ядерной дРНК (см. рис. 2). Иными словами, в составе тяжелой ядерной дРНК присутствуют как последовательности, переносящиеся затем в цитоплазму, так и последовательности, распадающиеся в ядре. Легкая ядерная РНК обогащается первым типом последовательностей. Однако эти выводы были сделаны на основании гибридизации при низких величинах C_0t , когда связываются лишь повторяющиеся последовательности. Тем самым прослеживалась судьба лишь части дРНК. Однозначное доказательство концепции про-мРНК было получено опять-таки лишь тогда, когда были развиты методы генной инженерии.

Гипотеза о возможной роли повторяющихся последовательностей^{1*} [32, 33]. Вторая концепция касалась организации эукариотических генов, или единиц транскрипции. Гипотезы, предложенные мною и Бриттеном с Дэвидсоном, пытались объяснить, с одной стороны, роль повторов и, с другой — причины образования гигантской про-мРНК. Предполагалось, что повторы лежат перед геном и служат сигналами для регуляции транскрипции. Другое предположение состояло в том, что регуляторные последовательности прочитываются РНК-полимеразой, а в дальнейшем подвергаются распаду. Таким образом, постулировалось, что 5'-конец про-мРНК не несет структурной информации и именно он разрушается в процессе созревания мРНК. Эта концепция в основном оказалась неверной, но она послужила развитию исследований по структуре про-мРНК и мРНК, поскольку ряд ее предсказаний мог быть проверен в опытах.

1.6. Другие особенности организации и работы генетического аппарата у эукариот

Наиболее явным отличием эукариот от прокариот является наличие у первых ядра, отграниченного ядерной мембраной от цитоплазмы, и вследствие этого разделение

в пространстве процессов синтеза ДНК и РНК, т. е. репликации и транскрипции (ядро) и синтеза белка, или трансляции (цитоплазма).

У бактерий имеется нуклеоид, т. е. область, где расположена ДНК. На ней идет синтез РНК, но уже на растущую мРНК садятся рибосомы, начинающие трансляцию. Образуется двойной комплекс ДНК—РНК-полимераза—мРНК и мРНК—рибосомы—растущие полипептиды.

В животной клетке эти два процесса строго разделены.

Другим важным отличием является связь ДНК в ядрах с особыми белками, гистонами, которые имеют положительный заряд и образуют с ДНК стехиометрические комплексы. Присутствие гистонов в эукариотических хромосомах в значительной мере определяет их конденсацию и упорядоченную организацию.

Третье отличие — это существование особых белков, взаимодействующих с мРНК и про-мРНК. В цитоплазме животных клеток, как показали А. С. Спирин и сотр., РНК связывается с определенными белками, образуя РНП-комплексы, названные А. С. Спириным информосомами.

В клеточном ядре О. П. Самарина в нашей лаборатории обнаружила другой тип рибонуклеопротеидных частиц, содержащих ядерную дРНК. Это ядерные про-мРНП (hnRNP), или ядерные информосомы. Они отличаются от цитоплазматических информосом по белковому составу и по структурной организации. Именно в составе ядерных частиц происходит превращение про-мРНК в мРНК и транспорт мРНК от мест синтеза к ядерной мембране. При переходе мРНК в цитоплазму белки, входящие в состав частиц, остаются в ядре (подробнее см. ниже).

Таким образом, еще в период, предшествующий появлению генной инженерии и других методов современной молекулярной биологии, в области изучения молекулярной биологии гена эукариотической клетки были получены весомые факты, которые указали на существование важ-

ных различий в экспрессии генов у эукариот и прокариот.

Их осмысливание, однако, ожидало новых экспериментальных подходов и новых данных.

1.7. Методическая революция 70-х годов

Современная молекулярная биология гена явилась результатом методической революции, которая за несколько лет полностью изменила лицо эксперимента. Хотя ключевыми здесь являются генная инженерия и секвенирование ДНК, другие методические подходы сыграли не меньшую роль. Чтобы сделать ясным дальнейшее изложение, кратко остановлюсь на этих основных методических подходах.

Гель-электрофорез нуклеиновых кислот [34]. Если в 60-х годах разделение нуклеиновых кислот по молекулярным массам вели в основном путем ультрацентрифугирования в сахарозном градиенте, то в 70-х годах этот метод вытесняется методом электрофореза в геле. Впервые он был широко применен болгарским исследователем Р. Цаневым и сотр., и затем быстро завоевал общее признание. Оказалось, что в геле ДНК и РНК движутся тем быстрее, чем ниже их молекулярная масса. Пройденное расстояние обратно пропорционально логарифму молекулярной массы. Особенно важно, что разрешающая способность метода благодаря низкой диффузии гораздо выше, чем у ультрацентрифугирования. Для низкомолекулярных нуклеиновых кислот электрофорез ведется в полиакриламидном геле, для высокомолекулярных — в агарозном. Чем ниже концентрация геля, тем более высокомолекулярные нуклеиновые кислоты могут в нем разделяться. Подбирая условия, можно разделить как короткие олигонуклеотиды, отличающиеся по длине всего на один нуклеотид, так и молекулы ДНК размером до нескольких миллионов пар нуклеотидов.

Расщепление ДНК рестриктазами [35]. В 1970 г. В. Арбер (Швейцария) и Х. Смит (США) открыли рестрик-

тазы — ферменты, с помощью которых бактерии расщепляют попавшую в них чужеродную ДНК. Эти эндонуклеазы узнают специфические последовательности ДНК и осуществляют по ним ее расщепление. Аналогичные последовательности в собственной ДНК не чувствительны к своей рестриктазе, так как они сразу после своего синтеза метилируются ферментом метилазой, узнающей те же самые последовательности. Рестриктазы II типа узнают обычно короткие палиндромы длиной 4—6 оснований. Например, популярная рестриктаза EcoRI узнает последовательность

$$\begin{array}{c} \text{GAATTC} \\ \text{CTTAAG} \end{array}$$

расщепляя ее между G и A. У разных видов бактерий рестриктазы различны, они узнают разные последовательности, и поэтому почти всегда можно подобрать фермент, расщепляющий исследуемую ДНК. Ферменты, узнающие гексануклеотиды, расщепляют ДНК на более длинные фрагменты, чем ферменты, узнающие тетрануклеотиды. Комбинируя обработку разными рестриктазами с последующим гель-электрофорезом, можно прокартировать изучаемый фрагмент ДНК, т. е. расположить по его длине места узнавания различными рестриктазами.

Блот-гибридизация [36]. ДНК, разделенную гель-электрофорезом, можно перенести с геля на нитроцеллюлозный фильтр. Для этого ее денатурируют в геле щелочью, нейтрализуют гель, и затем прикладывают к нему нитроцеллюлозный фильтр, обеспечивая медленный ток буфера через гель и фильтр. Денатурированная ДНК диффундирует и задерживается на фильтре, после нагревания которого в вакууме она «запекается» и иммобилизуется, т. е. обездвиживается на фильтре. Ее распределение на плоскости фильтра точно такое же, как и на плоскости геля. Однако в отличие от геля фильтр с ДНК можно использовать для последующей гибридизации с меченой пробой, т. е. с мечеными ДНК и РНК. Для этого инкубируют фильтр с раствором, содержащим

меченую пробу, при повышенной температуре, затем тщательно отмывают его и, наконец, подвергают автораддиографии, т. е. выдерживают с рентгеновской фотопленкой. При проявлении последней на ней выявляются полосы, соответствующие полосам ДНК на фильтре, сгибридизовавшимся с радиоактивной пробой.

Процедура переноса ДНК с геля на фильтр обозначается английским термином blotting (промокание). Поэтому для таких фильтров с ДНК используется термин «блот» (blot). По имени автора Саузерна эти блоты называются «блота́ми Саузерна» (Southern blots).

Вместо ДНК можно перенести на фильтры с геля РНК. Такие фильтры называют Норзерн-фильтрами [игра слов: фамилия Саузерн означает «южный»; фильтры с ДНК по Саузерну — южные блоты; фильтры с РНК шуточно обозначили как северные блоты (Northern); фильтры с белками — как западные (Western)].

Получение высокомеченных проб [37]. Чтобы проводить гибридизацию с Саузерн- и Норзерн-фильтрами, содержащими весьма малые количества индивидуальных ДНК и РНК, были нужны очень высокомеченные пробы. Их научились делать путем энзиматического введения метки в выделенные препараты нуклеиновых кислот. Наиболее распространенный метод — это так называемая никтрансляция (nick-translation). ДНК инкубируют с двумя ферментами, ДНК-полимеразой I и ДНКазой I (последняя берется в ничтожных количествах вместе с высокомечеными предшественниками ДНК, дезоксирибонуклеозидтрифосфатами. ДНКаза вносит в двухцепочечную ДНК одноцепочечные разрывы. На эти места садится ДНК-полимераза и разрушает одну из цепей ДНК, одновременно заново ее застраивая, но используя при этом меченые предшественники. Таким образом, большая часть ДНК замещается радиоактивной, сохраняя при этом свою нуклеотидную последовательность. Есть и другие методы включения метки в ДНК и РНК.

Синтез ДНК по матрице РНК [38]. В 1972 г. Г. Тёмин и Д. Балтимор (США) открыли обратную транскриптазу, или ревертазу, — фермент, осуществляющий синтез ДНК по матрице РНК. Его выделили из очищенных ретровирусов. Ревертаза нашла широкое применение в молекулярной биологии, особенно для синтеза ДНК на матрице мРНК. Большинство мРНК несут на своем 3'-конце поли(А)-последовательность (50—100 нуклеотидов длиной). Используя олиго(dT)-затравку, осуществляют с помощью ревертазы синтез цепи ДНК, комплементарной мРНК (кДНК), а затем достраивают вторую цепь либо с помощью той же ревертазы, либо с помощью ДНК-полимеразы I (работающей на матрице ДНК). Можно получить и меченую кДНК, если использовать меченые дезоксирибонуклеозидтрифосфаты. Полная ДНК-копия с мРНК содержит, очевидно, всю информацию для синтеза белка, т. е. соответствует структурной части того или иного гена.

Молекулярное клонирование [34, 39]. Ключевым методом явилось молекулярное клонирование фрагментов ДНК, или геновая инженерия в узком смысле слова. Этот метод, впервые описанный П. Бергом в США, позволяет наращивать большие количества любого отрезка ДНК, встраивая его в ДНК бактериальной плазмиды или бактериофага и заражая такой рекомбинантной ДНК бактерию-хозяина. Чаще всего в плазмиду или фаг встраивают либо фрагменты эукариотической геномной ДНК, либо кДНК, полученную в результате обратной транскрипции мРНК. Когда работают с плазмидами, то обычно используют такие, которые несут ген устойчивости к какому-либо антибиотику. В результате на среде с антибиотиком растут и дают колонии лишь те бактерии, в которые проникли рекомбинантные плазмиды. Когда работают с фагом, то следят за возникновением бляшек, т. е. очагов размножения фага, ведущего в лизису (разрушению) бактерий. Каждая колония или бляшка, полученная из одной исходной клетки, содержит один тип плазмиды

или фага, включающий один и тот же фрагмент чужеродной ДНК. Рассеивая далее такие колонии, получают чистый клон.

Одна из главных задач — поиск нужного клона. Если есть меченая «проба», например кДНК, синтезированная на мРНК, то нужный клон находят с помощью гибридизации с колониями. Делают отпечаток с чашки, на которой растут колонии, на нитроцеллюлозном фильтре. Затем проводят гибридизацию фильтра с меченой ДНК и выявляют колонии, связывающие меченую пробу. Эти колонии далее пересевают и получают клон, содержащий нужный ген. Есть и много других методов вылавливания нужных клонов из их множества, получаемого на первом этапе эксперимента.

Скоростные методы определения нуклеотидной последовательности ДНК ^{2*} [40–45]. Следующим важнейшим прорывом явилось создание методов, позволяющих быстро определить нуклеотидную последовательность в ДНК. Первый, химический, метод заключается в том, что у гомогенной ДНК (полученной с помощью рестриктаз) метится один конец, а затем в четырех разных порциях меченой ДНК проводят частичное расщепление цепи по тому или иному нуклеотиду (A+G, G, T+C, C). Затем разделяют каждую смесь с помощью высокоразрешающего электрофореза на дорожках одного и того же геля. Гели высушивают и экспонируют с рентгеновской пленкой, на которой после проявления виден набор полос, соответствующих фрагментам ДНК, начинающимся с меченого нуклеотида и обрывающимся на том или ином нуклеотиде (в зависимости от химической модификации). Таким образом, «с листа», содержащего четыре дорожки, можно прямо читать нуклеотидные последовательности. Идея метода была выдвинута в СССР С. К. Василенко и Е. Д. Свердловым, методы химических модификаций разработаны в значительной мере А. Д. Мирзабековым, работа над созданием общего метода начата им же вместе с У. Гилбер-

том, а полное завершение метода дано А. Максамом и У. Гилбертом в США.

Другой, энзиматический, метод был разработан Ф. Сэнгером в Великобритании. Исследуемый фрагмент ДНК при клонировании встраивается рядом с определенной последовательностью, к которой имеется комплементарная затравка. Используя такую затравку, ведут синтез ДНК *in vitro* с помощью ДНК-полимеразы в присутствии меченых дезоксирибонуклеозидтрифосфатов. Иногда вместо меченых предшественников используют меченую затравку. В результате происходит считывание исследуемого фрагмента. В реакционную смесь, разделенную на четыре порции, добавляют по одному из четырех дидезоксирибонуклеозидтрифосфатов в каждую. Последние способны включаться в растущую ДНК, вставая на правильное место, но затем останавливают дальнейший рост ДНК, терминируют ее синтез. Опять-таки проводят разделение смеси образовавшихся цепей ДНК электрофорезом и затем автордиографию. По четырем дорожкам читают нуклеотидную последовательность ДНК.

Многочисленные усовершенствования методов позволяют сегодня в относительно короткие временные интервалы расшифровывать последовательности ДНК длиной в десятки тысяч нуклеотидов.

Естественно, было разработано и много других важных методических подходов. С описанием некоторых из них мы встретимся ниже. Однако перечисленные выше сыграли решающую роль по крайней мере на первом этапе исследований. Они фактически вызвали революцию в молекулярной биологии гена эукариот.

1.8^{1*}. Первые результаты технической революции в молекулярной биологии гена

Как только началось изучение индивидуальных генов эукариотических клеток, было сделано два фундаментальных открытия, объяснивших два парадокса эукариотической клетки: 1) образование мРНК из гигантских про-мРНК и 2) существование избыточной ДНК и, в частности, разбросанных по геному повторяющихся последовательностей.

Первый из них оказался связанным с тем, что эукариотические гены имеют разорванную, прерывистую структуру: в их смысловую последовательность, кодирующую белок, врезаны последовательности ДНК, не несущие информации, причем на эти последние обычно приходится больше материала, чем на кодирующие последовательности. В ядре синтезируется про-мРНК, копия всего гена, но затем там же в ядре все бессмысловые участки вырезаются, а концы кодирующих последовательностей соединяются. Этот процесс был назван **сплайсингом**. Участки гена и соответствующей про-мРНК, вошедшие в состав зрелой мРНК, называют **экзонами**, а удаляемые участки — **интронами**. После удаления последовательностей интронов из про-мРНК зрелая мРНК транспортируется в цитоплазму. Прерывистость гена — важнейшая, функционально до сих пор не вполне понятная особенность организации эукариотической клетки.

Второе открытие, к которому прямое отношение имели исследования советских авторов, заключалось в установлении того факта, что многочисленные повторяющиеся последовательности ДНК, рассеянные по геному, представляют собою мобильные генетические элементы, т. е. последовательности, способные размножаться независимо от клетки и перемещаться в новые места генетического аппарата. Еще в 40-х годах Б. Мак-Клинтон в США в генетических опытах на кукурузе обнаружила мобильные, или прыгающие, гены, но это явление рассматрива-

лось как редкое исключение, своего рода курьез. Затем мобильные элементы были найдены у бактерий, но их число там сравнительно невелико

Теперь же оказалось, что эукариотический геном буквально нафарширован тысячами и даже сотнями тысяч мобильных генетических элементов, имеющих различную структурную организацию и разные механизмы для перемещения. Вариации в их числе и локализации являются одним из основных различий между представителями одного вида. Далее была установлена связь мобильных генетических элементов с вирусами, в частности с ретровирусами. Итак, вторая характерная и непонятная черта генома эукариот — наличие многочисленных повторяющихся последовательностей — тоже нашла свое объяснение.

Дальнейшие исследования стали концентрироваться, во-первых, на функциональном изучении генов, включая сюда контроль их репликации, транскрипции и других генетических процессов; во-вторых, структурной организации генов в хроматине и ее изменении при активации гена; в-третьих, на детальном изучении строения индивидуальных генов, что привело, в частности, к раскрытию механизмов иммуногенетических процессов, онкогенеза и многих других биологических явлений. Фактически возникли две новые науки — молекулярная иммунология и молекулярная онкология. Сегодня на повестке дня стоит решение вопросов молекулярных основ процессов биологии развития и нейробиологии.

Естественно, выше перечислены лишь некоторые основные направления. Общий поток молекулярной биологии гена значительно шире, и сейчас разбивается на необозримое число различных частных направлений. В следующих главах рассмотрены общие вопросы структуры и функционирования генома, причем выделены те разделы, в разработке которых участвовала наша лаборатория

Глава вторая

СТРОЕНИЕ

ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ ГЕНОВ

2.1. Экзоны и интроны

Открытие прерывистой структуры гена [46—49]. Прерывистая структура эукариотических генов и явлений сплайсинга были открыты при детальном изучении структуры генома аденовируса 2, одного из вирусов, содержащих ДНК.

Геном аденовируса — это линейная ДНК размером около 36 000 п. н. (36 т. п. н.); он содержит несколько десятков разных генов, кодирующие последовательности которых расположены в обеих цепях ДНК. На поздних стадиях инфекции клеток вирусом, незадолго до лизиса клеток, в основном транскрибируется одна из двух цепей ДНК («поздняя», или «L-цепь»), в которой находится не менее пяти генов, кодирующих белки, входящие в состав зрелого вируса (рис. 4). Эти гены рассеяны по всей длине L-цепи аденовируса.

Две группы в лаборатории Колд-Спринг-Харбор (США) изучали структуру поздних мРНК аденовируса и неожиданно обнаружили, что все они начинаются с одной и той же короткой последовательности, т. е. 5'-конец у всех пяти мРНК был одинаковым (см рис. 4). Далее оказалось, что эта последовательность не соседствует с поздними генами, а выявляется в левой части аденовирусного генома на значительном расстоянии от них. Более того, эта «лидерная последовательность» гибридизовалась с тремя разными участками левой половины

генома. Особенно четко такая структура мРНК выявляется при изучении гибридов между мРНК и ДНК аденовируса в электронном микроскопе. На электронных микрофотографиях отчетливо видно, что каждая поздняя мРНК аденовируса образует гибриды с четырьмя разными участками аденовирусного генома: тремя короткими, расположенными в его левой части, и одним длинным (собственно геном). В то же время появились данные, что главным первичным продуктом транскрипции аденовирусного генома на поздних стадиях инфекции является длинная РНК, считываемая почти со всей L-цепи.

Учитывая все это, единственным объяснением странной структуры аденовирусных мРНК являлось допущение, что вначале идет непрерывная транскрипция генома, образуется длинный предшественник мРНК (про-мРНК), затем из этой про-мРНК вырезаются внутренние участки, а образовавшиеся концы соединяются, связываются (см. рис. 4).

В 1977 г. этот вывод казался совершенно парадоксальным, не вытекающим из каких-либо теоретических предпосылок. Однако эксперимент был настолько ясен, что он был безоговорочно принят на симпозиуме 1977 г. в Колд-Спринг-Харбор, посвященном хроматину. Стало ясным, что по крайней мере гены аденовируса складываются из нескольких несоседствующих блоков, названных позднее экзонами. Экзоны, в свою очередь, разделены блоками ДНК, не выявляемыми в зрелой мРНК. Последние были названы интронами.

Новообразующаяся про-мРНК считывается непрерывно и поэтому содержит в своем составе и экзоны и интроны. Затем интроны вырезаются из про-мРНК, а концы экзонов соединяются. Это явление получило название сплайсинга.

Дальнейшее изучение транскрипции и сплайсинга поздних генов аденовируса позволило уточнить детали этого процесса. Транскрипция всегда начинается с первого экзона и кончается после прохождения РНК-полимеразы почти вдоль всего генома аденовируса. Затем в про-мРНК

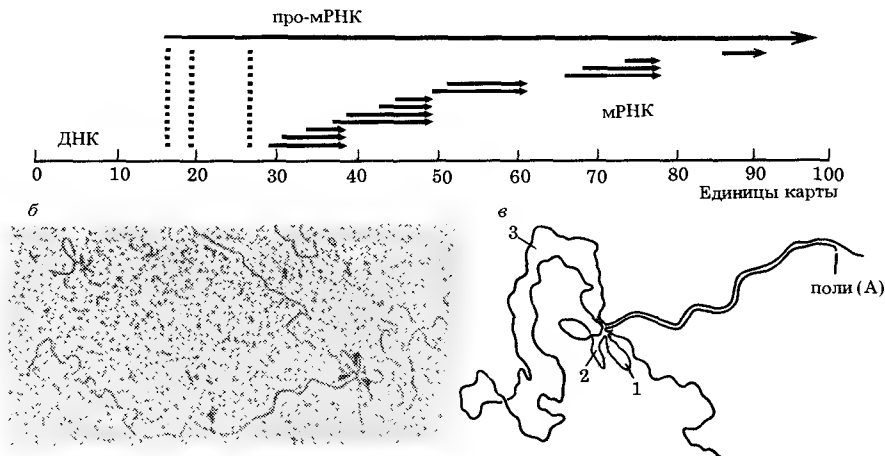


Рис. 4. Строение различных мРНК, синтезируемых на «поздней цепи» генома аденовируса 2

а — карта транскрипции. Видно, что поздние мРНК образуются из пяти областей вирусного генома. Однако, кроме того, каждая из этих мРНК содержит на своем 5' конце по три последовательности, происходящие из участков, лежащих на 16,6; 19,6 и 26,6 ед. карты. Эти три участка образуют лидер, входящий в состав каждой мРНК, участки между лидерными отрезками и между лидером и «телом» мРНК являются интронами и удаляются в результате сплайсинга. Наверху представлен гигантский первичный транскрипт поздней аденовирусной про-мРНК. Из него за счет формирования разных 3'-концов и разного сплайсинга образуется по крайней мере 13 разных мРНК (по одной из одного первичного транскрипта); *б* — электронная микроскопия гибрида между поздней (L) цепью аденовирусной ДНК и мРНК, гибридуемой с областью 67—79 (см. карту); *в* — схема, объясняющая структуру гибрида. Видно, что мРНК связывает четыре области вирусной ДНК, в результате чего образуются три пестля ДНК, соответствующие трем интронам (1, 2, 3) (по результатам, полученным Р. Робертсом, Ф. Шарпом, Т. Брокером, Дж. Дарнеллом и др.)

вносится разрыв сразу после одного из пяти генов, что и определяет судьбу про-мРНК. При сплайсинге удаляются интроны между 1-м и 2-м лидерами, между 2-м и 3-м лидерами и, наконец, весь отрезок про-мРНК между 3-м лидером и началом последнего экзона. Если, скажем, цепь оборвалась после третьего экзона, то экзоны, соответствующие двум первым генам, удаляются, т. е. в этом случае они являются частью большого третьего интрона (см. рис. 4).

Почти сразу после открытия экзон-интронной структуры гена у аденовируса аналогичное явление было обнаружено и у другого вируса, содержащего ДНК, обезьяньего вируса 40 (или SV40). Поначалу можно было думать, что разорванные гены и сплайсинг — это достояние вирусов. Однако уже в том же 1977 г. стало ясно, что разорванная структура генов — явление, распространенное гораздо шире.

Первые результаты были получены на генах β -глобина мыши и овальбумина кур. Оказалось, что фрагменты генома, с которыми гибридизуется мРНК соответствующих генов, в своей сумме намного превышают по размерам длину мРНК. Наиболее информативны данные по сравнению структуры геномного клона, содержащего данный ген, и кДНК-клона, т. е. клона, ДНК которого считана ревертазой с мРНК. В этом случае прямо сравнивается структура гена и мРНК.

Оказалось, что ген, кодирующий β -глобин, занимает у разных видов млекопитающих отрезок ДНК длиной около 1,5 т. п. н. Он состоит из трех экзонов, разделенных двумя интронами (рис. 5). При транскрипции образуется про-мРНК длиной ~ 1500 нуклеотидов. Она содержит в своем составе последовательности, соответствующие как экзонам, так и интронам. При сплайсинге интроны вырезаются, а три экзона составляют мРНК длиной около 700 нуклеотидов (~ 600 нуклеотидов — экзоны + ~ 100 нуклеотидов — поли (А)). Интересно, что в случае β -глобинового

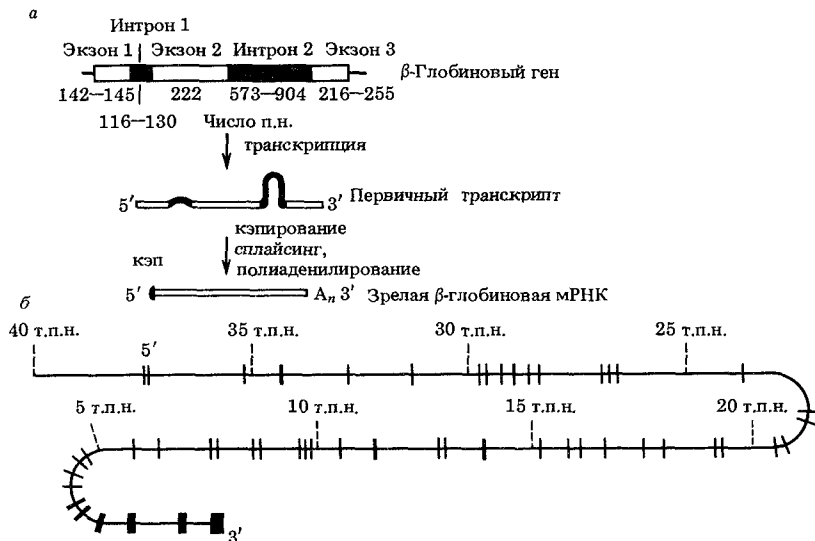


Рис. 5. Экзон-интронная структура эукариотических генов

а - β-глобиновый ген млекопитающих (цифры дают вариации размеров экзонов и интронов). Дано схематическое изображение про-мРНК и зрелой мРНК. Экзон 1 дает 5'-нетранслируемую область (30 нуклеотидов) и кодирует аминокислоты 1-30; экзон 2 кодирует аминокислоты 31-104; экзон 3 - аминокислоты, начиная со 105 до С-конца и 3'-нетранслируемую область; **б** - 1α2-коллагеновый ген курицы. Он состоит из более чем 50 экзонов (широкие блоки) и интронов (тонкая линия), занимая в геноме область 38 т.п.н. (по результатам, полученным Р. Флавеллом, Ф. Ледером, Т. Маниатисом, П. Доти, Х. Бедкер и др.).

гена интроны прерывают кодирующую часть гена (между 31-м и 32-м и между 105-м и 106-м кодонами). Этим β -глобиновый ген отличается от описанных выше поздних генов аденовируса, где лидерные последовательности не участвуют в кодировании белка.

Экзон-интронная организация эукариотических генов [50 --52]. После открытий, описанных в предыдущем разделе, данные об экзон-интронной организации эукариотических генов стали накапливаться по экспоненте. Клонировались все новые и новые гены, изучалась их структура, и оказалось, что экзон-интронная организация и сплайсинг — это не исключение, а правило, из которого, правда, бывают редкие исключения. Так, например, большинство генов, кодирующих гистоны (основные белки ядра — см. ниже), и гены, кодирующие интерфероны, не содержат интронов. Первичный транскрипт практически соответствует зрелой мРНК. Сплайсинг у этих РНК не происходит. Однако подавляющее число генов эукариот «интронированы» в той или иной степени, причем обычно общая протяженность последовательностей, приходящихся на интроны, в несколько раз превосходит протяженность всех экзонов и поэтому про-мРНК обычно в несколько раз длиннее, чем зрелая мРНК.

Число интронов в гене колеблется в широких пределах — от одного до нескольких десятков. Рекордное число интронов (около 50!) обнаружено в коллагеновом гене (рис. 5). Размеры как экзонов, так и интронов тоже варьируют в очень широких пределах. Например, в коллагеновом гене есть экзоны длиной всего в 45—54 п. н., каждый из которых кодирует всего лишь 15—18 аминокислот.

Размер интронов иногда составляет всего несколько десятков пар нуклеотидов, а иногда, например в случае ряда генов дрозофилы (*D. melanogaster*), достигает нескольких десятков тысяч пар нуклеотидов.

Рассмотрим некоторые особенности строения интронов. Одной из характерных черт является консервативность локализации интронов в родственных генах одного вида или в одинаковых генах разных видов. В то же время нуклеотидная последовательность самих интронов мало консервативна и подвергается быстрым изменениям в эволюции. Поэтому интроны, расположенные в одних и тех же местах родственных генов, могут сильно различаться по нуклеотидным последовательностям. Они, во всяком случае, гораздо менее консервативны, чем экзоны.

Интроны крайне разнообразны по структуре и не содержат каких-либо строго специфических для интронов нуклеотидных последовательностей. Только на границе между экзонами и интронами удается обнаружить сходство между разными интронами. Так, на границе между экзоном и началом интрона выявляется последовательность $\begin{smallmatrix} A \\ C \end{smallmatrix} AG / GT \begin{smallmatrix} A \\ G \end{smallmatrix} AGT$. Это так называемый донорный сайт сплайсинга. На другом конце интрон-экзонное сочленение, или донорный сайт сплайсинга, представлено последовательностью $YYYYYYYYYYNYAG/N$, где Y — пиримидин и N — любой нуклеотид.

Однако это лишь усредненные последовательности, которые на самом деле варьируют в широких пределах. По-настоящему консервативны лишь два первых и два последних основания в интронах: $GT \dots AG$. Они выявляются практически во всех интронах. Кроме того, на расстоянии в 10—30 нуклеотидов от 3'-конца интрона выявляется еще одна общая для разных интронов последовательность $CT \begin{smallmatrix} G \\ A \end{smallmatrix} \begin{smallmatrix} C \\ T \end{smallmatrix}$. Эти последовательности, как будет видно из дальнейшего изложения, участвуют в реакциях сплайсинга.

Теперь мы рассмотрим более подробно экзон-интронную структуру двух генов, клонирование которых было осуществлено в нашей лаборатории.

Клонирование и структура гена клеточного Т-антигена, или р53^{1*} [53, 54]. Один из этих генов — ген для белка, называемого **клеточным опухолевым антигеном** (клеточным Т-антигеном) или, более кратко, р53. Последний термин обозначает, что это белок (protein) с молекулярной массой 53 000. Белок этот интересен тем, что его содержание повышено во многих опухолях млекопитающих (мышь, человек). Он относится к классу ядерных белков — локализуется в клеточном ядре и обладает способностью связываться с ДНК. Впервые клонирование гена, кодирующего р53, было осуществлено П. М. Чумаковым в нашей лаборатории. Поскольку клонирование слабо экспрессируемого гена является довольно сложной работой, я привожу основные этапы клонирования.

Так как, по расчетам, мРНК для белка р53 должна была составлять не более 0,01 % от всей мРНК, то тотальную мРНК клеток опухоли SVT2 мыши вначале обогащали по р53-мРНК. Для этого выделяли из клеток мРНК, ультрацентрифугировали ее в сахарозном градиенте, собирали фракции РНК и вели на каждой из них синтез белка *in vitro*, добавляя в смесь меченую аминокислоту, метионин-³⁵S]. Из инкубационной смеси осаждали белки антителами к р53 и после электрофореза определяли появление меченого белка, имеющего ту же подвижность, что и р53. Фракции, которые содержали мРНК, обеспечивающие синтез р53, собирали и использовали для синтеза на них комплементарной ДНК (кДНК) с помощью фермента ревертазы (см. разд. 1.7). Синтезированную двухцепочечную ДНК встраивали в плазмиду и клонировали. Затем проводили поиск колоний, содержащих ДНК гена р53. С этой целью из клона выделяли ДНК и на эту ДНК вылавливали соответствующую ей мРНК путем гибридизации. Далее, на отловленной мРНК синтезировали меченый белок и определяли его природу с помощью антител к белку р53, как описано выше. Из примерно 100 проверенных таким образом клонов был получен один, содержащий ДНК, которая связывала мРНК для белка р53. Используя меченую ДНК полученного клона как зонд для гибридизации, вели поиск других клонов, содержащих другие части гена р53 мыши. Для этого вели гибридизацию меченой ДНК прямо с колониями бактерий, перенесенными и выращенными на фильтре (см. разд. 1.7). В результате было поймано еще несколько клонов и входящие в них вставки

вместе перекрыли почти всю мРНК для гена р53. Так было осуществлено клонирование полной кДНК, или экзонной части гена р53. Вскоре после этого клонирование гена р53 было осуществлено и рядом других авторов.

Чтобы выделить геномный клон р53, использовали «библиотеки» клонированных фрагментов тотальной ДНК мыши или человека. ДНК фрагментировали рестриктазами и встраивали в бактериофаг λ , которым затем заражали бактерии. Образовывалось множество бляшек. С ними гибридизовали ДНК ранее полученных клонов и таким образом находили колонии фагов, содержащие ген р53. В результате были изолированы полные геномные копии гена р53 мыши и человека. Сравнение между собою геномных и кДНК клонов позволяет выяснить экзон-интронную структуру гена. Такая работа была проделана почти одновременно в ряде лабораторий, в том числе в нашей В. Л. Бухманом и Н. Н. Нинкиной, которые анализировали ген р53 человека (рис. 6). Видно, что этот ген содержит 11 экзонов и 10 интронов.

В мРНК различают три главных области — кодирующую, с которой считывается белковая последовательность, а также две нетранслируемые области — 5'-концевую и 3'-концевую.

В гене р53 вслед за начальным экзоном, который весь входит в состав 5'-нетранслируемой области, идет очень большой интрон длиной 10,4 т. п. н. Остальные 10 экзонов расположены гораздо ближе друг к другу: длина интронов варьирует от 81 п. н. до 2,5 т. п. н., а экзонов — от 22 п. н. до 1260 п. н. (последний экзон). Маленькие экзоны выявляются лишь путем определения нуклеотидной последовательности кДНК и геномной ДНК. Таким образом, общий размер гена равен $\sim 18,3$ т. п. н., из которых на экзоны приходится $\sim 2,6$ т. п. н. В результате про-мРНК примерно в 7 раз длиннее, чем зрелая мРНК. Интересно, что ген р53 мыши, хотя и отличается от человеческого по нуклеотидным последовательностям,

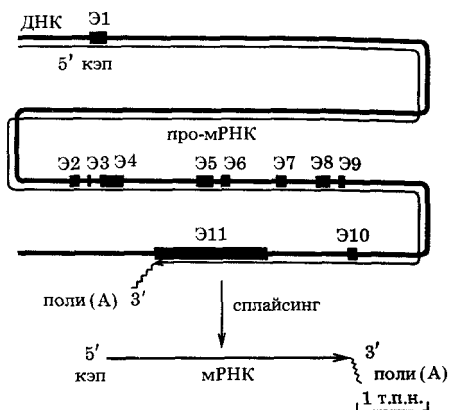


Рис 6 Экзон-интронная структура онкогена р53 человека

Экзоны даны широкой линией и буквой Э с номером экзона. Указан первичный транскрипт и зрелая мРНК (по результатам, полученным В. Л. Бухманом, О. П. Самариной и др.)

особенно в интронах, имеет точно такую же организацию. В нем также некодирующий белок экзон отделен очень большим (6,3 т. п. н.) интроном от кластера из 10 кодирующих экзонов. Интроны располагаются в тех же самых местах, что и у гена мыши. Таким образом, общая структура гена весьма консервативна.

В ходе клонирования геномных копий было получено два варианта клонов, различающихся между собою по рестриктной карте. Они представляют собою два аллельных варианта гена р53, встречающихся в человеческой популяции. Оба варианта кодируют полноценный белок, хотя даже в аминокислотной последовательности белка имеются небольшие различия.

Клонирование гена и определение его структуры является обычно первым шагом по пути выяснения функционирования гена и регуляции его активности. В случае р53

использование клонированного гена позволило отчасти пролить свет и на функцию самого белка р53. Р. Вайнберг и ряд других ученых в США показали, что при введении этого гена в нормальные клетки и его последующей активной работе (синтезе мРНК и белка) клетки претерпевают ряд изменений, характерных для опухолевых клеток. Они становятся «бессмертными», т. е. приобретают свойство неограниченно размножаться при выращивании вне организма, в культуре клеток. На основе этих опытов ген р53 был отнесен к онкогенам, т. е. генам, изменения в которых могут вести к раковому превращению клеток.

Клонирование и структурная организация гена эстеразы S дрозофилы (*D. virilis*) ^{1*} [55]. Другой ген, проклонированный в нашей лаборатории, — это ген для фермента эстеразы S дрозофилы (*D. virilis*), который был открыт и хорошо изучен в Институте биологии развития АН СССР Л. И. Корочкиным. Интересной особенностью гена является то, что его продукт, эстераза S, синтеризуется только в одном типе клеток — эпителиальных клетках семявыносящих луковиц дрозофилы, т. е. он относится к генам, участвующим в дифференцировке клеток.

Клонирование гена было осуществлено в нашей лаборатории Г. Н. Ениколоповым в сотрудничестве с Б. И. Кузиным (лаборатория Л. И. Корочкина). Стратегия клонирования была другая, чем в случае гена р53. Она базировалась на знании локализации гена в хромосомах и места экспрессии гена. Во-первых, как отмечалось выше, синтез эстеразы S идет исключительно в семявыносящих луковицах. Предварительные оценки показывали, что до 10 % всего вновь образующегося белка в этом органе составляет эстераза S. Можно было ожидать поэтому, что концентрация мРНК для эстеразы S в семявыносящих луковицах будет очень высокой (не менее 1 %) и поэтому хотя бы один клон из 100, гибридизующихся с мРНК (или синтезированной на ее матрице кДНК), будет содержать нужный ген.

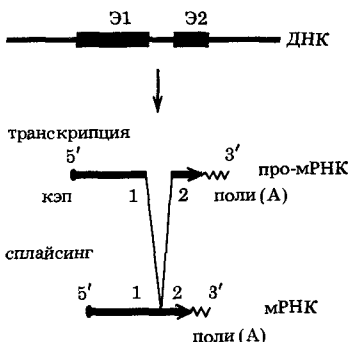
Исходя из этого, вначале получали клоны, содержащие фрагменты геномной ДНК *D. virilis*. Далее, на мРНК из семявыносящих луковниц синтезировали с помощью ревертазы меченую ДНК и гибридизовали ее с колониями. Те колонии, ДНК которых активно связывала метку, наращивали, выделяли из них ДНК, метили ее и гибридизовали с препаратами политенных хромосом слюнных желез личинок *D. virilis*.

В некоторых органах дрозофилы, в частности в слюнных железах личинок, удвоение ДНК не сопровождается делением клеток. В результате каждая хромосома содержит не одну — две гигантские молекулы ДНК, но несколько тысяч нитей ДНК, лежащих строго параллельно друг другу, — образуются огромные политенные (многонитчатые) хромосомы. Вариации в степени конденсации ДНК создают в них чередования плотных участков, дисков, и междисковых промежутков (их около 6000). Все области хромосом и диски имеют свои обозначения. Проводя гибридизацию меченой РНК и ДНК с фиксированными препаратами политенных хромосом, ДНК которых денатурирована, и определяя места связывания метки по засвечиванию фотоэмульсии, которой покрывают хромосомы, можно точно определить, в каком месте хромосомы расположен тот или иной ген. Локализация гена эстеразы на политенных хромосомах была уже выяснена ранее Л. И. Корочкиным в генетических опытах. Ген был расположен в районе 2Ge5 второй хромосомы. Таким образом, если ДНК клона (проведенного уже через тест гибридизации с мРНК из семявыносящих луковниц) свяжется с областью 2Ge5 второй хромосомы, то с очень большой вероятностью этот клон будет содержать эстеразный ген. Действительно, из 50 отобранных на первом этапе клонов два связались с областью 2Ge5, и один из них содержал ген эстеразы S.

Однозначное доказательство было получено при инъекции ДНК клона в ядра овоцитов лягушки. Этот тест был впервые введен в практику М. Бирнстилом (Швейцария) для изучения регуляции транскрипции. Введенная в овоцит лягушки чужеродная ДНК становится там матрицей для

Рис. 7. Экзон-интронная структура гена эстеразы S *Drosophila virilis*

Экзоны даны жирной линией и обозначены буквой Э с номером (по результатам, полученным Г. Н. Ениколоповым и соавт.)



синтеза мРНК, а на последней в цитоплазме овоцита активно синтезируется белок. Действительно, после введения ДНК клона в ядра овоцитов лягушки в последних начался активный синтез эстеразы S дрозофилы, которую далее выявляли с помощью иммунологического теста.

Имея геномный клон эстеразы S и соответствующую мРНК, Г. Н. Ениколопов сравнил их путем гибридизации мРНК с фрагментами ДНК и тем самым проанализировал экзон-интронную структуру гена, представленную на рис. 7. Из последнего видно, что ген состоит из двух экзонов, разделенных небольшим интроном. Вообще, обычно размеры интронов у насекомых меньше, чем у позвоночных.

С помощью клонированной последовательности была изучена транскрипция гена эстеразы S. Оказалось, что содержание мРНК для эстеразы S в клетках семявыносящих луковиц по крайней мере на три порядка выше, чем в других клетках дрозофилы. Те редкие транскрипты, которые выявляются в других клетках, начинаются с точек, отличающихся от места старта главного транскрипта семявыносящих луковиц. Таким образом, только в дифференцированных клетках идет активная экспрессия гена эстеразы S.

Почему существуют интроны? [56—58]. Открытие экзонов и интронов дало объяснение первому парадоксу органи-

зации генома у эукариот, а именно большим размерам единиц транскрипции, намного превышающим размеры собственно генов. Действительно, на интроны приходится гораздо больше ДНК, чем на экзоны, и соответственно про-мРНК существенно длиннее, чем зрелая мРНК.

В то же время разорванная структура эукариотических генов была одной из крупнейших неожиданностей в молекулярной биологии. Она не вытекала из каких-либо априорных соображений, а просто явилась неумолимым выводом из результатов эксперимента. Однако, как только она стала совершившимся фактом, начались попытки осмысливания этого явления. Возник вопрос, зачем природе понадобилось вводить сложный процесс сплайсинга, включающего разрывы и соединения концов РНК и уничтожение трех четвертей синтезированной про-мРНК, вместо того чтобы просто иметь непрерывные гены, как в случае прокариотических организмов.

Остановлюсь на ряде высказанных в разное время гипотез. Прежде всего возникла идея, что сплайсинг с его способностью объединять разъединенные отрезки ДНК в один ген может играть важнейшую роль в эволюции, в частности в объединении разных генов в один и, следовательно, разных полипептидных цепей в одну. Тем самым сравнительно легко могут возникать новые гены. Эти представления находят подтверждение при сравнении экзон-интронной структуры некоторых генов и так называемой доменной структуры соответствующих им белков. Ряд белков состоит из нескольких доменов, т. е. блоков, разделенных структурно и функционально. Классическим примером является фермент ДНК-полимераза I. Хотя она и представлена одной непрерывной полипептидной цепочкой, но состоит фактически из двух разных ферментов: собственно ДНК-полимеразы (синтезирующей ДНК) и экзонуклеазы (разрушающей ДНК с конца). Эти два домена образуют две независимые компактные частицы, связанные между собою коротким полипептидным мостиком. Послед-

ний легко разрушается при мягкой обработке протеиназами, когда домены остаются неповрежденными в силу своей компактности. Это ведет к разделению доменов.

В эукариотических организмах белков, состоящих из нескольких доменов, очень много. Оказалось, что в тех случаях, когда в составе белка можно различить несколько доменов, то в гене на границе между отрезками, кодирующими соседние домены, как правило, присутствует интрон. Каждый домен, таким образом, представлен одним или несколькими экзонами. Можно допустить, что когда-то домены были разными генами, но затем в результате мутаций на их границах появились сигналы для сплайсинга и в результате произошло их объединение и создание нового гена. Ярким примером являются гены для мембранных белков рецепторов. У этих белков всегда есть по крайней мере четыре домена: 1) сигнальный пептид, который используется для направления синтезируемого белка в полость эндоплазматического ретикулума (после прохождения туда он отщепляется); 2) наружный домен, несущий участок связывания для лиганда, т. е. соединения, к которому имеет сродство данный рецептор; 3) трансмембранный домен, гидрофобный отрезок полипептидной цепи, пересекающий мембрану, и 4) внутренний домен, имеющий сходство у разных рецепторов и обладающий ферментативной активностью (протеин-киназа). Эти домены в составе гена всегда разделены между собою интронами.

Не менее яркий пример — это гены иммуноглобулинов или гены комплекса гистосовместимости (рис. 8).

Другой путь создания полидоменного белка — это дупликация (удвоение) какого-то отрезка ДНК, содержащего ген, и последующее соединение двух одинаковых участков в один ген за счет сплайсинга РНК. Дупликация генов или просто неких сегментов ДНК — явление, широко распространенное у эукариот и несомненно играющее очень большую роль в эволюции. Действительно, многие гены

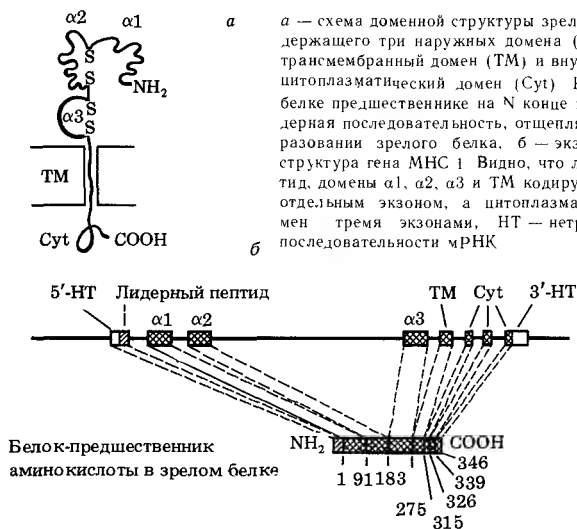


Рис 8 Связь между экзонами и белковыми доменами на примере гена гистосовместимости МНС, класс I

представлены в геноме не одной копией, но несколькими, образуя семейство родственных генов. В ряде случаев можно показать, что такие умножившиеся отрезки ДНК объединились в один ген. Хорошим примером является упомянутый выше коллагеновый ген с его многочисленными экзонами и интронами (см. рис. 5). Целая серия экзонов этого гена имеет сходную структуру, кодируя полипептид (глицин-пролин-Х)_n, который многократно повторяется в коллагене. Очевидно, небольшой отрезок ДНК, кодирующий этот полипептид, размножился за счет повторных дупликаций, образовав множество экзонов, которые благодаря сплайсингу объединяются в составе коллагеновой мРНК.

Однако далеко не всегда удается связать экзоны с белковыми доменами, а интроны — с междоменными границами. Иногда интрон оказывается, например, внутри 5'-или 3'-нетранслируемой области или внутри области, явно соответствующей одному домену. Поэтому объяснить наличие интронов только полидоменной структурой белка нельзя.

Другое представление, касающееся природы и значения интронов, заключается в предположении о регуляторной роли этих последовательностей в экспрессии (работе) генов. Во-первых, в одном и том же гене сплайсинг иногда может протекать по-разному. Примером могут служить так называемые ранние гены вируса SV40, т. е. гены, работающие на ранних стадиях инфекции клеток вирусом. Область ранних генов занимает около половины всего генома вируса, его кольцевой ДНК, имеющей в длину всего 5,2 т. п. н. Оказалось, однако, что «ранняя область» кодирует два разных белка с совершенно различной аминокислотной последовательностью. Это является следствием различного, или **альтернативного, сплайсинга**, происходящего с одной и той же молекулой про-мРНК. Как отмечалось выше, сигнальные последовательности для сплайсинга **вырождены**, т. е. довольно разнообразные последовательности в РНК могут выполнять роль таких сигналов. Неудивительно, что в некоторых про-мРНК, например в ранней про-мРНК SV40, присутствует несколько таких сигналов (в данном случае два варианта), которые обуславливают несколько возможных типов сплайсинга одной и той же про-мРНК. В результате для «ранней области» вируса SV40 из одной про-мРНК образуется две разных мРНК, кодирующих два разных полипептида, названных большой Т-антигеном (Т) и малый Т-антигеном (t). Т означает *tumor*, т. е. Т-антиген, — это вирусный опухолевый антиген. Такое название эти белки получили потому, что они присутствуют в опухолях, вызванных вирусом SV40, и от них зависят онкогенные свойства этого вируса.

Много примеров альтернативного сплайсинга получено на аденовирусе, где часто из одной и той же про-мРНК образуются по две, три или четыре разных мРНК, кодирующих разные белки (см. рис. 4). Существенно, что при альтернативном сплайсинге часто происходят изменения рамки считывания, т. е. одна и та же нуклеотидная последовательность дает разные аминокислотные последовательности. Для вирусов это особенно важно, так как позволяет более экономно использовать генетический материал, обеспечивает компактизацию генетической информации у вируса. Поскольку для клеточного генома ограничений по размеру не существует, то там явление альтернативного сплайсинга встречается реже и, как правило, рамка считывания сохраняется неизменной. Для многих генов вообще существует только один возможный вариант сплайсинга, и из одной про-мРНК образуется лишь один тип мРНК. Тем не менее и для генов эукариот можно найти много случаев альтернативного сплайсинга, при котором часто (по крайней мере, в случае вирусов) все варианты реализуются с определенной частотой, прежде всего в зависимости от последовательности нуклеотидов на границе экзона и интрона и от места положения сайта сплайсинга.

Использование того или иного типа сплайсинга не является объектом контроля. Однако в некоторых случаях реализуется и такая возможность. Например, у дрозофилы существует генетический элемент (называемый Р-элементом), кодирующий фермент транспозазу, который катализирует вырезание из генома и обратное встраивание в геном Р-элемента. Ген транспозазы состоит из четырех экзонов и трех интронов. При этом в большинстве клеток дрозофилы из про-мРНК вырезаются только два первых интрона, и полученная в результате мРНК не способна синтезировать транспозазу. Только в зародышевых клетках дрозофилы появляется некий дополнительный фактор, который обеспечивает вырезание третьего интрона. В результате только в этих клетках возникает активная транс-

позаза, что, в свою очередь, проявляется в вырезании из генома и встраивании в геном Р-элемента. В других клетках таких перемещений Р-элемента по геному выявить не удастся.

Если искусственно с помощью генноинженерных методик удалить из гена транспозазы третий интрон и ввести такой Р-элемент в геном дрозофилы, то тогда он меняет свое поведение. Зрелая мРНК, кодирующая транспозазу, появляется во всех типах клеток, и в любых клетках организма становятся возможными перемещения Р-элемента.

Иными словами, на этой системе путем контроля процесса сплайсинга осуществляется регуляция активности гена.

Имеются и другие сходные примеры.

Итак, сплайсинг может играть роль в создании новых генов в ходе эволюции, в более полном и экономичном использовании записанной в геном информации и, наконец, в регуляции экспрессии генов. Весьма вероятно, что существуют и другие «приложения» для сплайсинга. Следует, однако, подчеркнуть, что, скорее всего, разорванная структура гена и сплайсинг возникли не в результате перехода от прокариот к эукариотам, но, напротив, они имелись уже у наиболее древних форм жизни, в частности у архебактерий. В настоящее время появляются свидетельства в пользу того, что первичная жизнь существовала в форме РНК, которая была и носителем генетической информации (вместо ДНК), и осуществляла ферментативные функции (вместо белков). Сплайсинг — это как раз тот процесс, который во многих случаях катализируется самой РНК без участия белка даже в современных организмах (см. гл. 6). Неудивительно поэтому, что процессы сплайсинга могли существовать даже у древнейших организмов, а далее они уже использовались для выполнения разных биологических задач.

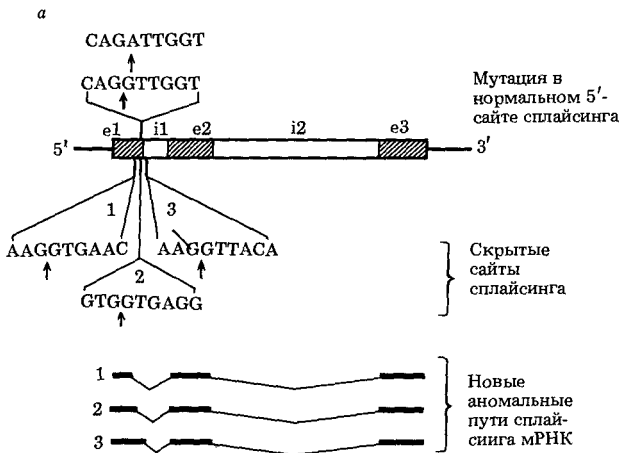
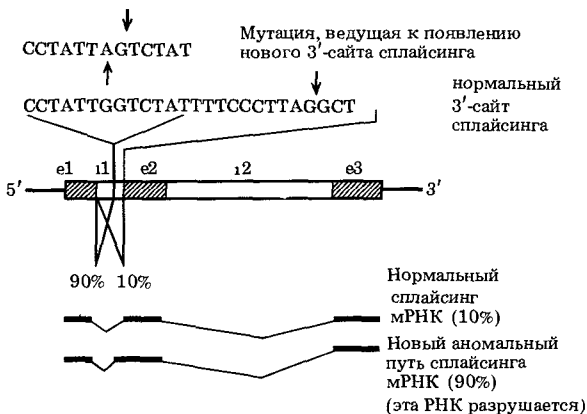


Рис. 9. Примеры мутаций, ведущие к нарушениям сплайсинга β -глобиновой про-мРНК и, как следствие, к β -талассемии

a - точечная мутация (G → A) на 5'-границе первого интрона инактивировала донорный (5') сайт сплайсинга. В результате стали использоваться три «скрытые» сайты сплайсинга и образовываться три «неправильные» мРНК. В результате синтез β -глобина не происходит (по результатам, полученным Т. Маниатисом и соавт.); *б* - точечная мутация (G → A) в первом интроне привела к возникновению в нем сильного донорного сайта сплайсинга, который успешно конкурирует с сайтом правильного сплайсинга. В результате 9/10 всей β -глобиновой мРНК становится дефектной, и синтез β -глобина падает в 10 раз; *e* — экзоны, *i* интроны (по результатам, полученным С. А. Лимборской и соавт.)

Нарушения экзон-интронной структуры и генетические болезни ^{2*} [59, 60]. Хотя мутации внутри интронов обычно проходят бесследно, мутации, затрагивающие границу между экзоном и интроном, могут иметь далеко идущие последствия. Огромный материал в этом отношении накоплен для мутаций в β -глобиновом гене, которые ведут к наследственной болезни β -талассемии. Разными исследовательскими группами проклонированы β -глобиновые гены из большого числа пациентов с β -талассемией, при которой нарушается адекватный синтез β -глобина. В тех случаях,



когда грубых изменений в организации β -глобинового гена не наблюдалось, был проведен анализ первичной нуклеотидной последовательности. При этом оказалось, что часто при β -талассемии β -глобиновый ген имел единичные нуклеотидные замены как раз в области сочленений между экзонами и интронами. Это ведет к инактивации сайта сплайсинга, т. е. интрон перестает отсекается от экзона в правильном месте. Обычно, однако, в нуклеотидной последовательности интрона находится другой участок, напоминающий по структуре сочленение. Этот участок и берет на себя функции сайта для сплайсинга. Их называют поэтому скрытыми сайтами сплайсинга. Однако при этом новая мРНК оказывается резко измененной и неспособной обеспечить синтез нормального β -глобина (рис. 9).

Бывают случаи, когда точечные мутации и внутри интрона порождают нарушения в сплайсинге. Это обычно связано с появлением в результате такой мутации последовательности, напоминающей усредненный сайт для сплайсинга. В настоящее время, начиная с классических

работ Т. Маниатиса (США), описано много таких мутаций, характерных для талассемий из разных регионов.

Так, С. А. Лимборской и сотр. (Институт молекулярной генетики АН СССР) был проклонирован β -глобиновый ген от больного талассемией из Азербайджанской ССР и определена его полная нуклеотидная последовательность. И здесь дело оказалось связанным с точечной заменой (см. рис. 9). В 110-м положении от начала интрона вместо дезоксигуанозина оказался дезоксиаденозин. Эта замена привела к тому, что в данном месте интрона возник диноклеотид AG в специфическом окружении, весьма сходном с тем, которое имеется в конце интрона. Таким образом, в интроне данного талассемийного гена оказалось два сигнала сплайсинга - истинный и дополнительный. В результате этого те механизмы, которые удаляют интрон, могут осуществлять это двумя альтернативными путями, используя либо истинный сигнал, либо дополнительный.

При этом оказалось, что дополнительный сигнал, располагающийся в цепи РНК раньше, является значительно более активным, чем истинный сигнал. Поэтому у больного в процессе созревания β -глобиновой мРНК образуются два типа молекул. В 10 % случаев возникают нормальные мРНК. Большая же их часть (до 90 %) является дефектной и образуется за счет использования нового сигнала сплайсинга. Дефектные мРНК быстро разрушаются в клеточном ядре вскоре после своего синтеза. Таким образом, в цитоплазме эритроидных клеток больного имеются лишь нормальные β -глобиновые мРНК, однако их количество снижено в 10 раз. У больного образуется в 10 раз меньше β -глобинового белка, что резко нарушает нормальную продукцию молекул гемоглобина в целом и приводит к развитию клинических признаков β -талассемии.

Следовательно, мутации, ведущие к нарушению сплайсинга, играют существенную роль в возникновении ряда наследственных болезней человека. Очевидно, что раз они

так сильно меняют функциональную организацию гена, то им может принадлежать существенная роль и в процессах создания новых генов в ходе эволюции.

2.2. Организация 5'- и 3'-концов в первичном транскрипте и мРНК

Поли (А) [61, 62]. После того как были развиты гипотезы о структуре единиц транскрипции (см. разд. 1.5), возник вопрос о возможных путях их проверки. Поскольку в тот момент генноинженерные подходы еще не были доступны, единственным возможным путем было изучение строения про-мРНК и мРНК и их сравнение между собою. Прежде всего надо было промаркировать их концы — 5' и 3'.

Такая работа была начата в ряде лабораторий. Первый важный результат был получен М. Эдмондс и Дж. Браверманом (США), которые обнаружили, что на 3'-конце почти всех мРНК и примерно половины молекул про-мРНК находится отрезок поли(А) длиной от 50 до 200 нуклеотидов. Такие отрезки поли(А) не были найдены в геноме. Отсюда вытекало, что они присоединяются посттранскрипционно, т. е. к 3'-концу уже синтезированной на матрице ДНК про-мРНК. Действительно, дальнейшие эксперименты показали, что только что синтезированная про-мРНК лишена поли(А), но вскоре происходит его ферментативное нематричное присоединение. Процесс полиаденилирования про-мРНК происходит в ядре. В цитоплазме поли(А) обычно укорачивается и поэтому средний размер поли(А) в про-мРНК выше, чем в мРНК. Поли(А) служит надежным маркером 3'-конца в мРНК и про-мРНК. Более того, за поли(А) можно выловить мРНК из смеси с другими РНК цитоплазмы путем хроматографии на поли(У)сефарозе или олиго(dТ)целлюлозе. Поли(А) при этом образует гибриды, и мРНК задерживается на колонке, откуда ее элюируют, понижая ионную силу раствора и повышая его температуру. Таким образом удается получить мРНК

с высокой степенью чистоты. Следует при этом отметить, что в ряде генов имеются короткие (обычно 15—30 п. н.) сегменты олиго(А). Они, естественно, присутствуют в промРНК, а иногда и в мРНК. Такие РНК тоже задерживаются при хроматографии, даже если они не содержат длинных поли(А), но их легко отделить, так как они элюируются с колонки в более мягких условиях, чем РНК с длинными поли(А) концами.

Другим важным методом, связанным с использованием поли(А), является обратная транскрипция мРНК. К смеси мРНК и ревертазы добавляют олиго(dT), выступающую в роли затравки. Олиго(dT) связывается с поли(А), и с 3'-конца олиго(dT) начинается синтез ДНК, комплементарной мРНК.

В заключение следует подчеркнуть, что не все мРНК содержат поли(А). Есть ряд исключений, наиболее ярким из которых являются мРНК, кодирующие гистоны. Почти все мРНК для гистонов не содержат поли(А) тракта на своем 3'-конце.

Кэп [63]. 5'-Конец мРНК тоже имеет особую структуру. Американский исследователь А. Шаткин обнаружил, что он содержит характерную химическую группировку, названную затем кэпом. Практически все молекулы промРНК и мРНК содержат кэп, или, как говорят, они «кэпированы». Первый этап кэпирования — это присоединение к 5'-концу РНК GTP. Последний (pppG) присоединяется фосфоэфирной связью к ферменту гуанилилтрансферазе, теряя пирофосфат: $\text{pppG} + \text{E} \rightarrow \text{E} \sim \text{pG} + \text{pp}$. Далее ферментный комплекс взаимодействует с трифосфорилированным 5'-концом растущей гяРНК, представленным обычно А или G ($\text{E} \sim \text{pG} + \text{pppNpN} \dots \rightarrow \text{E} + \text{G}_5' \text{ppp}_5' \text{NpN} \dots + \text{p}$), т. е. трифосфатная группа взаимодействует по обеим сторонам с 5'-гидроксилом рибозы, и по обеим сторонам РНК оказываются свободные 3'-гидроксильные группы. Затем происходит метилирование гуанозина по 7'-положению.

Следующий этап — метилирование по 2'-положению

рибозы между первым и вторым основаниями. В результате возникает следующая химическая группировка, устойчивая к действию ряда рибонуклеаз и щелочи: $7^{\text{me}}\text{G}_5\text{·ppp}_5\text{·Nr}^{\text{m}}\text{pN} \dots$, которая, собственно, и называется кэпом. Иногда кэп может увеличиваться в размерах на один нуклеотид за счет метилирования еще одной рибозы (а также первого аденина): $7^{\text{me}}\text{G}_5\text{·pppAr}^{\text{m}}\text{pNr}^{\text{m}}\text{pN} \dots$. При обработке РНК щелочью или смесью рибонуклеаз образуется смесь 2', 3'-моонуклеотидов (Nr) и устойчивые к этим обработкам кэпы, которые легко отделить хроматографически благодаря большим размерам и заряду. Очевидно, что кэп синтезируется посттранскрипционно, но это происходит настолько быстро, что большинство молекул про-мРНК оказывается кэпировано. По-видимому, ферменты кэпирования тесно связаны с РНК-полимеразой II, образуя единый комплекс, так что немедленно после начала транскрипции они осуществляют кэпирование 5'-конца новообразованной РНК.

Следует отметить, что не все синтезируемые в клеточном ядре РНК подвергаются кэпированию. Дело в том, что транскрипция разных генов идет при участии разных РНК-полимераз. Есть три разные РНК-полимеразы. РНК-полимераза I, находящаяся в ядрышке, отвечает за синтез про-рРНК, из которой затем образуется 28 и 18S рРНК. РНК-полимераза II синтезирует про-мРНК и некоторые малые РНК. Именно с РНК-полимеразой II связаны ферменты кэпирования, и только РНК, синтезированные РНК-полимеразой II, кэпируются. Наконец, РНК-полимераза III отвечает за синтез 5S РНК, всех тРНК и ряда малых РНК. Как показал в нашей лаборатории Д. А. Крамеров, часть гяРНК также транскрибируется РНК-полимеразой III.

Транскрипты РНК-полимеразы I и III не кэпированы. Они содержат на 5'-конце просто трифосфатные группы ($\text{pppNrNrN} \dots$). Почти все они (за рядом исключений) не подвергаются также и полиаденилированию.

Границы единицы транскрипции. Первичный транскрипт и его процессинг [64]. Те участки ДНК, по которым происходит экпирование и которые соответствуют таким образом точкам начала транскрипции, называют «кэп-сайтами», или «сайтами экпирования». Места, по которым происходит полиаденилирование, обозначают как «сайты полиаденилирования». Они соответствуют 3'-концам зрелых мРНК.

Если сайт экпирования является местом, с которого начинается транскрипция, то сайт полиаденилирования не совпадает с точкой окончания транскрипции. РНК-полимераза II прочитывает ДНК за сайтом полиаденилирования, иногда проходя еще дистанцию длиной в несколько сот или даже тысяч нуклеотидных пар. Вскоре, однако, РНК разрезается, и по образовавшемуся новому 3'-концу происходит полиаденилирование. Остальная часть первичного транскрипта (за сайтом полиаденилирования) подвергается быстро разрушению в ядре.

Таким образом, первичный транскрипт, или про-мРНК, подвергается в клеточном ядре целому ряду превращений. Происходит экпирование его 5'-конца, созревание 3'-конца, заключающееся в расщеплении по сайту полиаденилирования, и затем само полиаденилирование. Наконец, происходит сплайсинг и удаление интронов. Эти процессы — экпирование, созревание 3'-конца, полиаденилирование и сплайсинг — в совокупности обозначаются как «процессинг про-мРНК», или «созревание мРНК».

Выше уже говорилось о том, что для сплайсинга необходимо наличие определенных нуклеотидных последовательностей на границе экзонов и интронов. Экпирование протекает, очевидно, на любом 5'-конце РНК, синтезированном РНК-полимеразой II. Для созревания 3'-конца и его полиаденилирования требуются некоторые специфические нуклеотидные последовательности. Почти во всех мРНК за 15–30 нуклеотидов до полиаденилированного 3'-конца расположена последовательность AAUAAA. Изредка

вместо нее выявляется AUUAAA. Последовательность ААТААА (ААUААА) называют «сигналом для полиаденилирования». Перед точкой полиаденилирования или после нее часто лежит пентануклеотид САУUG (У — пиримидин, U — пурин нуклеотид). Наконец за сайтом полиаденилирования, начиная с 10—15-го нуклеотида, лежит последовательность, богатая G и T, которая важна для расщепления РНК по сайту полиаденилирования. Ее удаление, так же как и удаление ААТААА блока, ведет к нарушению созревания 3'-конца мРНК. Из вышеизложенного следует, что созревание мРНК из про-мРНК — это сложный многоступенчатый процесс, и ряд последовательностей в составе про-мРНК прямо используется для контроля соответствующих реакций.

Функция последовательностей, лежащих у 5'- и 3'-концов мРНК [65, 66]. Каждая мРНК состоит из трех частей: лидерной, или 5'-нетранслируемой, кодирующей и концевой, или 3'-нетранслируемой, последовательностей. Их длина варьирует в широких пределах. Обычно лидерная последовательность имеет в длину несколько десятков нуклеотидов, но бывают лидеры длиной в несколько сот нуклеотидов. Концевая последовательность, как правило, длиннее, от нескольких сот до тысячи и более нуклеотидов. Между ними лежит открытая рамка считывания, или кодирующая область.

Значение нетранслируемых последовательностей до конца не понято. Сам 5'-конец мРНК, несущий кэп, необходим для начала трансляции. Есть данные, что мРНК, где лидерная последовательность между кэпом и иницирующим кодоном в начале кодирующей зоны очень велика, транслируется плохо. Удаление значительной части лидера ведет к тому, что уровень трансляции существенно возрастает.

Нетранслируемая 3'-концевая последовательность, вероятно, тоже может выполнять функциональную нагрузку. Есть данные, что некоторые последовательности в ее

составе, богатые Т (U), резко дестабилизируют мРНК, так что время жизни такой мРНК в цитоплазме оказывается очень небольшим. Удаление соответствующей области из гена резко удлиняет время жизни мРНК.

Наличие поли(А) на 3'-конце мРНК, видимо стабилизирует мРНК. Лишенные поли(А) РНК, хотя и транслируются, но время их жизни сокращается.

Таким образом, 5'- и 3'-нетранслируемым частям мРНК может принадлежать определенная роль в регуляции экспрессии генов на уровне синтеза белка, или трансляции. Однако для финальных выводов необходимы дополнительные исследования.

В следующем разделе мы рассмотрим вопрос о том, какие последовательности отвечают за определение начала (инициации) и окончания (терминации) транскрипции, а также за ее интенсивность и специфичность.

2.3. Регуляторные последовательности эукариотического генома

Промоторы РНК-полимеразы II: ТАТА, СААТ и CG-блоки [67—70]. У эукариот собственно гены, или транскрибируемые отрезки ДНК, разделены между собою протяженными отрезками молчащей, нетранскрибируемой ДНК, которые были названы спейсерами, или разделителями. Однако из того, что эти участки не транскрибируются, отнюдь не следует, что они не играют никакой роли в транскрипции. Напротив, накапливается все более данных, что именно преимущественно в спейсерах располагаются те сегменты ДНК, которым принадлежит решающая роль в регуляции работы генов, т. е. в регуляции транскрипции.

Когда была определена первичная структура ряда эукариотических генов, авторы начали сравнивать между собою нуклеотидные последовательности, расположенные перед разными генами. Д. Хогнесс (США) обнаружил, что за 20—30 п. н. перед сайтом кэпирования (т. е. точкой

начала транскрипции), как правило, лежит последовательность, которая в усредненном виде имеет структуру ТАТАААТА. По краям она обычно обрамлена короткими участками, обогащенными G и C. Первоначально эта последовательность была обозначена как «Hogness box», или блок Хогнесса, но затем за ней закрепилось название «ТАТА-box», или ТАТА-блок. Оказалось, что в полном виде она часто отсутствует, и наиболее характерным является сочетание ТАТА или ТАТААА.

Поскольку ТАТА-блок расположен недалеко от точки начала транскрипции, можно было ожидать, что он выполняет функции промотора, т. е. элемента, связывающего РНК-полимеразу. Действительно, некоторые мутации в ТАТА-блоке, например замены А на G, часто резко снижают уровень транскрипции гена.

М. Бирнстил в Швейцарии изучил роль ТАТА-блоков в транскрипции на следующей остроумной системе. В ядра овоцитов лягушки вводили путем микроинъекции кольцевые ДНК, содержащие гены гистонов морского ежа, после инкубации из них выделяли РНК и определяли содержание в ней транскриптов с гистоновых генов морского ежа. Кроме того, определяли точки начала транскрипции. Оказалось, что в овоцитах лягушки гистоновые гены морского ежа правильно транскрибируются, т. е. транскрипт начинается с того же нуклеотида, что и в клетках морского ежа. Далее из гена был удален участок, содержащий ТАТА-блок. При этом уровень синтеза мРНК остался почти неизменным, но вместо одной точки инициации появилось несколько новых, т. е. нарушилась специфичность инициации. Был сделан вывод, что ТАТА-блок определяет точное место начала транскрипции. Возможно, что он связывает белковые факторы при взаимодействии с которыми РНК-полимераза II приходит в активное состояние, состояние готовности к началу транскрипции.

Следует отметить, что не все гены имеют ТАТА-блок. В некоторых генах вместо ТАТА-блока лежит последова-

тельность, сильно отличающаяся от него, но в то же время точно определяющая место начала транскрипции. В других случаях (например, поздние гены SV40) отсутствие ТАТА-блока ведет к тому, что транскрипция гена начинается с нескольких разных мест.

Помимо ТАТА-блока, во многих, но не во всех случаях, еще дальше от сайта экпирования в области —40 — —100 п. н. располагается СААТ-блок, название которого отражает его усредненную структуру, ССААТ. (Здесь и далее используются обозначения областей перед геном числом со знаком (—), считая нулевой точкой отсчета сайт экпирования, т. е. точку старта транскрипции.) Удаление области, содержащей СААТ-блок, часто резко снижает уровень транскрипции.

Наконец, перед многими генами, которые активны во всех типах клеток организма (house-keeping genes, или гены домашнего хозяйства), часто выявляется последовательность ССGССС или соответственно GGGCGG (CG-блоки). Иногда встречается несколько таких блоков. Они расположены в той же области, что и СААТ-блок, и являются важными элементами транскрипции. Вероятно, CG-блоки как СААТ-блок, можно считать составным элементом ряда промоторов РНК-полимеразы II.

ТАТА, СААТ и CG-блоки обнаружены только перед генами, транскрибируемыми РНК-полимеразой II. Транскрипция генов, считываемых РНК-полимеразой III, вообще не зависит от последовательностей, расположенных перед геном, а определяется промотором, который лежит внутри этих генов и состоит, в случае генов тРНК, из двух блоков, разделенных отрезком ДНК длиной ~20 п. н. Первый блок начинается через 8—30 п. н. после точки инициации транскрипции и представлен в усредненном виде последовательностью TGGC³NNAGTGG. Усредненная последовательность для второго блока — (+51 — +72) GGTTCGAN³NCC. Таким образом, промотор для РНК-полимеразы III — это в большинстве случаев расчлененный промотор.

Промотор для РНК-полимеразы I охарактеризован недостаточно хорошо. Удаление последовательностей, расположенных на том или ином расстоянии перед началом транскрипции рРНК, ведет во многих случаях к резкому снижению уровня синтеза рРНК. Однако эти участки у разных видов имеют разную структуру. Поэтому хотя участки спейсеров, соответствующие по своим свойствам промоторам, удастся выявить, но невозможно дать для них усредненную последовательность.

В целом следует отметить определенное сходство между организацией промотора у эукариот и у бактерий. У эукариот наиболее важными элементами промотора являются ТАТА-блок и часто СААТ-блок, расположенные на расстоянии —25 и —40 — —100 п. н. от стартовой точки.

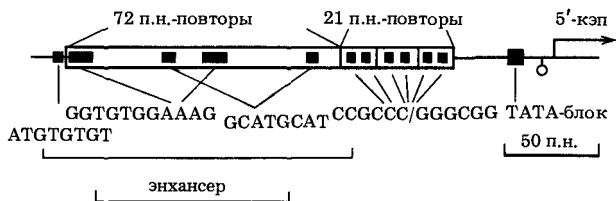
У бактерий им соответствует блок Прибнова (ТАТААТ), расположенный примерно за 10 п. н. от старта, кстати очень похожий по последовательности на ТАТА-блок, и элемент —35 (TGTTGACA), расположенный за 35 п. н. от старта.

Однако у эукариот, как видно из дальнейшего изложения, существуют еще другие регуляторные элементы, обладающие рядом необычных свойств, для которых у бактерий нет аналогов. Речь идет об энхансерах и сайленсерах.

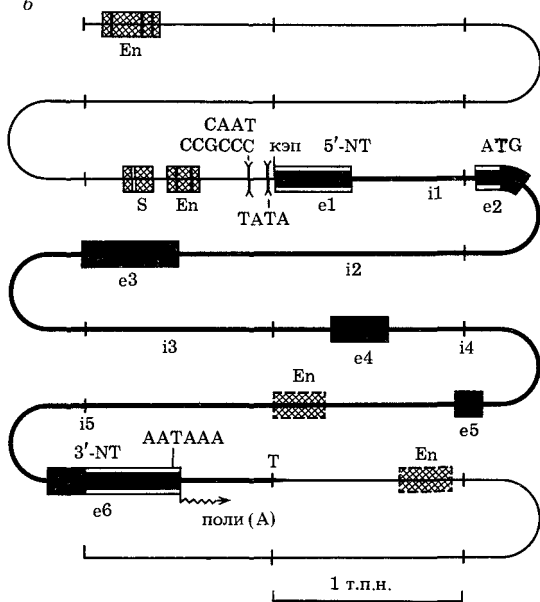
Открытие энхансеров [71, 72]. После того как М. Бирнстил и сотр. обнаружили, что уровень транскрипции изучаемого ими гистонового гена в ооцитах лягушки почти не меняется после удаления ТАТА-блока, они исследовали влияние на уровень транскрипции других участков ДНК, лежащих перед геном. Неожиданно оказалось, что при вырезании более удаленной от гена области, расположенной за 185 п. н. от сайта кэпирования, происходит примерно 100-кратное снижение уровня транскрипции гена. Иными словами, был открыт мощный позитивный регуляторный элемент в составе гистонового гена.

Сразу же было установлено, что этот элемент обладает двумя исключительно интересными свойствами. Его можно

а



б



было поставить на то же место, где он был, но при этом изменить его ориентацию относительно гена на противоположную, и тем не менее активность гена при этом полностью восстанавливалась. Более того, активный фрагмент ДНК можно было встроить не перед геном, а за геном и опять-таки получить восстановление уровня транскрипции. Таким образом, расположение и ориентация открытого регуляторного элемента не играли решающей роли для его функционирования. Важно лишь было, чтобы он был физически соединен с геном (цис-элемент). Эта последовательность была названа «модулятором».

Вскоре после этого В. Шаффнер и сотр. (Швейцария) провели опыты по изучению контроля транскрипции ранних генов вируса SV40 (рис. 10). К клеткам культуры добавляли ДНК вируса и изучали в них синтез Т-антигена, основного продукта «ранней области» генома вируса. Это было возможно благодаря проникновению части добавленной ДНК в ядра клеток. Опять-таки исследовали влияние вырезания разных участков вирусной ДНК на работу гена. Было найдено, что удаление участка, расположенного от —110 до —260 п. н. по отношению к раннему гену, снижает активность гена примерно на два порядка. Область генома вируса SV40, обладавшая регуляторной активностью, включала в себя две повторяющиеся последовательности длиной в 72 п. н. каждая, которые поэтому обозначают как 72 п. н.-повторы. За ней располагаются три повторяющиеся последовательности длиной по 24 п. н. (24 п. н.-повторы). Удаление двух 72 п. н.-повторов

Рис. 10. Регуляторные последовательности эукариотического генома

а — регуляторные последовательности эукариотического вируса SV40. Черными прямоугольниками даны «сердцевинные» последовательности энхансера и важнейшие элементы промотора (по результатам, полученным В. Шаффнером и соавт.); *б* — схема «усредненного» эукариотического гена, состоящего из 6 экзонов (*е*) и 5 интронов (*и*) (в масштабе). Указаны энхансеры (*En*) и сайленсер (*S*) с их сердцевинными последовательностями (блоки внутри), возможные локализации энхансеров, элементы промотора, нетранскрируемые области (5' НТ и 3' НТ) гена, иницирующий кодон (AUG)

полностью инактивировало регуляторный элемент, в то время как удаление одного из 72 п. н.-повторов вообще не влияло на его активность. Как и в опытах с гистоновым геном, изменение ориентации элемента 72 п. н. или его встраивание после гена не влияло на его активирующее транскрипцию действие. Также и вставка других последовательностей между 72 п. н.-повтором и геном не снимала его эффект, хотя в некоторых случаях и несколько снижала его. Авторы называли открытый ими элемент энхансером, или усилителем, и это название вытеснило затем термин модулятор.

Итак, под энхансером понимают генетический цис-элемент, обладающий усиливающим транскрипцию действием, которое практически не зависит от расположения элемента относительно контролируемого им гена. Подобные контрольные элементы не были известны у прокариот и их открытие указывало на существование особого типа регуляции транскрипции у эукариотических организмов.

По мере изучения экспрессии разных генов оказывалось, что почти у каждого гена есть свой энхансер, а иногда и несколько. Это общее свойство эукариотических генов, и оно заслуживает поэтому более подробного рассмотрения.

Методы изучения регуляции транскрипции. Прежде всего следует остановиться на основных методических подходах для изучения регуляции транскрипции у эукариот. В работе, как правило, используются клонированные гены, в которые вносят те или иные структурные изменения. В простейшем случае, о котором речь шла выше, можно вырезать какой-либо фрагмент ДНК с помощью подходящих рестриктаз и лигировать (сшить) между собой концы с помощью другого фермента, ДНК-лигазы. Можно, наоборот, встроить в то или иное место клонированной ДНК другие последовательности, разрезая ДНК в этом месте рестриктазой и затем вшивая туда вставку лигазой. Для вырезания более коротких блоков

ДНК используют экзонуклеазную реакцию. После расщепления плазмиды рестриктазой в одной точке ее обрабатывают экзонуклеазой, разрушающей одну из цепей ДНК с ее свободного конца (3' или 5'). Реакцию можно вести так, чтобы удалить желаемое число нуклеотидов ДНК. Затем нуклеазой S1 удаляют одноцепочечные «хвосты» и лигируют концы ДНК.

Можно не удалять сегменты ДНК, но вносить в них нуклеотидные замены. Для этого существует много способов. Например, можно синтезировать олигонуклеотид, имеющий ту же последовательность, что и сегмент исследуемого гена, но с одной нуклеотидной заменой. Если этот фрагмент сгибризовать с одноцепочечной ДНК плазмиды или фага и затем достроить ДНК до полной двухцепочечной копии ДНК-полимеразой I, то при заражении бактерий такой ДНК будут получены колонии, содержащие нормальную, и колонии, содержащие измененную, мутантную ДНК. В настоящее время имеется много других методов, позволяющих вносить любые желаемые изменения в ДНК и затем с помощью клонирования нарабатывать эту измененную ДНК в больших количествах.

Второй этап исследования — это введение ДНК в ту или иную систему транскрипции. Простейшей системой являются экстракты, приготовленные из клеток или из изолированных ядер, способные инициировать и вести транскрипцию. Однако уровень транскрипции в них невысок, и часто эффекты, выявляемые *in vivo*, с экстрактами наблюдать не удастся. Другой подход включает инъекцию ДНК в ядра крупных клеток, например овоцитов лягушки (М. Бирнстил, Швейцария) или выюна (М. Я. Тимофеева, Институт молекулярной биологии АН СССР). Введенная ДНК «одевается» белками и далее может активно транскрибироваться в овоцитах. Недостатком системы является ее гетерологичность, так как обычно работают с генами из других организмов, и ограниченность. Третья, широко используемая система — это временная экспрессия при

трансфекции. Для этого ДНК добавляют в культуру клеток и вызывают ее проникновение внутрь их путем обработки фосфатом кальция или с помощью электрошока. Проникая в ядра клеток, ДНК транскрибируется в них в течение большего или меньшего промежутка времени. При этом можно использовать гомологичные системы. Минусом является низкий уровень синтеза, так как количество вошедшей в клетки экзогенной ДНК весьма невелико. Наконец, наиболее сложным, но, видимо, и наиболее адекватным методом является получение трансгенных животных. Для этого в ядра оплодотворенных яйцеклеток мыши или других млекопитающих или в эмбрионы дрозофилы вводят клонированную ДНК, а затем получают полноценных животных (для млекопитающих необходима имплантация яйцеклеток в матку). Многие из полученных животных оказываются со встроенным в них чужеродным геном. Экспрессию последнего можно легко изучать в разных органах и тканях.

На третьем этапе опыта, а именно для изучения работы гена также существуют различные подходы. Один из них — выявление синтеза белка, кодируемого геном. Для этого часто используются иммунологические методы анализа, позволяющие легко выявлять белок, к которому есть антитела. Иногда в конструкции ДНК удаляют свой ген, а на его место встраивают ген фермента хлорамфениколацетилтрансферазы (САТ), экспрессию которого очень легко детектировать по ферментативной активности, проводя реакцию с меченым субстратом.

Другим походом к изучению экспрессии гена является исследование транскрипции. Наиболее часто используемый метод — анализ с помощью нуклеазы S1, разрушающей одноцепочечную ДНК и РНК (S1-анализ). Для проведения S1-анализа РНК, выделенную из системы, гибридизуют с высокомеченным рестриктным фрагментом ДНК, подобранным так, чтобы он включал область начала транскрипции. Гибриды обрабатывают нуклеазой S1 и после

электрофоретического разделения выявляют меченые фрагменты ДНК, устойчивые к нуклеазе S1. Таким способом можно не только количественно определить уровень синтеза данной РНК, но и правильность инициации транскрипции. Существует еще много других вариантов анализа, которые здесь не рассматриваются.

Свойства энхансеров [71—80]. Весь перечисленный арсенал методов позволил детально изучить свойства энхансеров.

Прежде всего энхансеры — это цис-элементы. Они активны только в том случае, если находятся в составе одной и той же молекулы ДНК с регулируемыми ими генами.

Энхансеры не обладают полярностью. Их ориентацию можно менять, не снижая практически их активность.

Местоположение энхансеров также можно менять в довольно широких пределах. Уже отмечалось, что энхансеры можно переносить в места, расположенные за геном, за его 3'-концом. Можно также удалять энхансер от 5'-конца гена, вставляя между ними другие последовательности ДНК. Правда, если при этом будет встроен ТАТА-блок, то в ряде случаев может произойти переключение транскрипции — она будет начинаться с последовательности, расположенной сразу же за этим новым ТАТА-блоком. Уровень же правильной транскрипции соответственно снизится.

И в природе энхансеры могут занимать разное положение относительно гена. Чаще всего они располагаются перед геном на расстоянии в несколько сотен пар нуклеотидов от сайта экпирования. Последнее время появляется много сообщений об энхансерах, расположенных на гораздо большем расстоянии, в позициях —3 — —6 т. п. н. В нескольких случаях энхансеры были обнаружены в интронах. Классическим примером являются энхансеры генов для тяжелых цепей иммуноглобулинов, которые лежат в интроне, разделяющем экзоны, кодирующие переменную и константные части иммуноглобулинов. Описаны

случаи, когда энхансеры лежат со стороны 3'-конца гена. Наконец иногда свойствами энхансера обладают кодирующие последовательности генов. Такая ситуация описана для одного из гистоновых генов морского ежа и для α -глобинового гена.

Энхансер безразличен по отношению к тому гену, который он регулирует. Вместо своего гена можно, например, подставить ген САТ из бактерий, и его транскрипция будет в такой же мере активироваться энхансером, как и транскрипция его «родного» гена.

Энхансеры обладают слабой видовой специфичностью. Они способны проявлять свою активность в клетках отдаленных видов: например, энхансер гистоновых генов морского ежа работает в клетках лягушки, энхансер гена теплового шока дрозофилы — в клетках млекопитающих. Тем не менее в «своих» клетках энхансеры работают несколько лучше. Энхансер обезьяньего вируса SV40 в 3 раза более активен в клетках обезьяны, чем в клетках мыши, а энхансер вируса лейкоза мышей — наоборот.

В то же время некоторые, хотя далеко не все энхансеры проявляют выраженную тканевую специфичность. Так, энхансер гена тяжелых цепей иммуноглобулинов активен исключительно в лимфоидных клетках, а энхансер глобиновых генов — только в клетках эритроидного ряда. Большинство генов, избирательно работающих в определенных дифференцированных клетках, содержат энхансеры, активные только в соответствующих клетках. Иными словами, энхансеры выступают как важный фактор дифференцировки. Наряду с тканеспецифичными существуют энхансеры с широким спектром действия, как, например, энхансер вируса SV40.

Энхансеры варьируют в широких пределах по силе своего действия. Есть слабые, активирующие транскрипцию всего в несколько раз, и сильные, эффект которых измеряется двумя или тремя порядками. Наиболее сильным из известных в настоящее время является энхансер цитомегаловируса.

Один ген может содержать несколько энхансеров, различающихся по своим свойствам. Например, гены, кодирующие лизоцим, альбумин, овальбумин и ряд других, содержат по крайней мере по два энхансера. Один, расположенный недалеко от сайта экпирования, обеспечивает тканевую специфичность работы гена, но лишь довольно слабо активирует транскрипцию. Другой энхансер, расположенный за несколько тысяч пар нуклеотидов (3—7 т. п. и.) перед сайтом экпирования («дальний энхансер»), обладает очень сильной стимулирующей активностью, обеспечивая высокий уровень экспрессии гена.

Наконец, энхансеры могут контролироваться различными клеточными факторами, например гормонами. Так, у вируса рака молочных желез мышей в энхансере имеется несколько последовательностей, узнаваемых глюкокортикоидным рецептором. Удаление этих последовательностей инактивирует энхансер. В то же время активирующее действие энхансера проявляется только в присутствии соответствующего гормона.

Таким образом, энхансеры — это большая и разнообразная группа регуляторных элементов клетки, способных обусловить тонкую и разнообразную регуляцию работы генов.

Структура энхансеров [75—76]. Естественно, возник вопрос о структуре энхансеров и о роли этой структуры в их активности. Простое сравнение нуклеотидных последовательностей выявляет существование некоторых коротких последовательностей, сходных для различных энхансеров. Однако для установления связей между структурой и функцией были проведены однозначные опыты по мутагенезу энхансера путем внесения в последний делеций или нуклеотидных замещений. Тем самым удастся определить границы энхансера и выявить в его составе функционально активные элементы.

Границы энхансера в большинстве случаев оказываются размытыми. С какого-то места удаление или заме-

шение нуклеотидных последовательностей вызывает постепенное уменьшение активности энхансера.

Обычно, однако, в энхансере выявляются дискретные области, мутации в которых резко понижают его активность. Часто такие области соответствуют зонам гомологии между разными энхансерами. Таким образом были выделены активные блоки или энхансерные сердцевинные последовательности. Сюда относится, например, последовательность CGTGTGGAAAG, выявленная в энхансере SV40 (в 72 п. н.-повторе). В усредненном виде (GGTGTGG^{AAA}_{TTT} G) она встречается и в целом ряде других энхансеров, например вируса полиомы или вируса саркомы мышей. Кроме нее, в энхансере SV40 выявлено еще две сердцевинные последовательности, содержащие чередующиеся пурины и пиримидины: ATGTGTGT и GCATGCAT (см. рис. 10).

Другая консервативная последовательность выявляется в энхансерах разных генов теплового шока. Ее структура G—GAA—TTC—G. Обнаружены характерные последовательности в составе металлотионеиновых энхансеров и энхансеров, реагирующих на глюкокортикоиды. По-видимому, в ближайшее время число таких «энхансерных сердцевин» сильно возрастет.

Иногда энхансер включает в себя сразу несколько разных консервативных сердцевин, встречающихся в других энхансерах. Сюда относится, например, энхансер цитомегаловируса, который в настоящее время является самым сильным из известных энхансеров.

Между блоками энхансеров часто наблюдается синергизм в действии. Так, повреждение каждого из консервативных блоков энхансера SV40 снижает эффект от энхансера в 4—5 раз, а повреждение сразу двух — примерно в 100 раз.

Интересно, что если синтезировать ДНК, в которой

просто повторен несколько раз один из эссенциальных блоков, например GGTGTGGAAAG, то такая синтетическая последовательность может успешно заменять природный энхансер. Если блок повторен 8 раз, то активность синтетического энхансера и 72 п. н.-повтора одинаковы. Таким образом, по крайней мере, некоторые энхансеры имеют модульную организацию.

К вопросу о природе этих модулей и вообще о механизме работы энхансеров мы вернемся в гл. 4.

Здесь отметим лишь еще одно, по-видимому, весьма важное свойство энхансеров, которое, правда, еще не распространено на все энхансеры. В опытах с иммуноглобулиновыми генами были получены клеточные мутанты миеломы (опухолевые клетки, активно синтезирующие иммуноглобулин), в которых энхансер был утрачен (делеция), но это никак не сказывалось на уровне транскрипции гена. Если же таким геном трансфецировать клетки, он оказывается полностью неактивным. Чтобы сделать ген активным, к нему надо снова подшить энхансер. Иными словами, роль по крайней мере некоторых энхансеров сводится к включению транскрипции гена, но не к поддержанию ее. Обобщение этого положения требует, однако, дальнейших исследований.

Сайленсеры, или ослабители транскрипции [81—83]. Вскоре после энхансеров обнаружили последовательности, по своим свойствам весьма напоминающие энхансеры, но имеющие, так сказать, обратный знак. Это сайленсеры — элементы, угнетающие транскрипцию, элементы негативного контроля.

Сайленсеры выявляются по активации транскрипции, после того как из клонированного сегмента генома удаляют определенную последовательность. В настоящее время описан целый ряд последовательностей такого типа. Например, сайленсер перед геном овальбумина кур содержит участок связывания глюкокортикоидного рецептора. В присутствии гормона достигается высокий уровень

экспрессии гена. Однако если удалить отрезок ДНК, содержащий сайленсер, то тот же высокий уровень транскрипции гена получается и в отсутствие гормона. Вообще, синтез РНК становится независимым от добавления гормона, переходя из индуцибельного в конститутивный. Следовательно, сайленсер в данном случае выступает в качестве негативного элемента транскрипции, ингибирующее действие которого на транскрипцию преодолевается, однако, при связывании гормон-рецепторного комплекса.

Сайленсеры обладают многими общими свойствами с энхансерами. Они могут действовать на большом расстоянии от гена. Их ориентацию можно менять, не меняя при этом их действие. Как и энхансеры, они обладают только *цис*-действием, влияя на гены, находящиеся в той же молекуле ДНК, что и сайленсер.

Механизм действия как сайленсеров, так и энхансеров пока не известен. Ряд возможностей рассматривается в гл. 4.

Сигналы терминации транскрипции [84]. Терминация транскрипции генов у эукариот — это пока довольно плохо изученный процесс. Ясно, однако, что он происходит за пределами собственно гена в области спейсера.

Это было впервые показано Дж. Дарнеллом (США), который выделил клеточную РНК после очень короткой инкубации клеток с меченым предшественником (порядка 1 мин) и затем исследовал гибридизацию этой РНК с фрагментами клонированной аденовирусной ДНК или ДНК глобинового гена (в зависимости от типа изучаемых клеток). Все фрагменты гена связывают метку пропорционально своей молекулярной массе, что указывает на более или менее равномерное движение РНК-полимеразы вдоль матрицы. Оказалось, однако, что и участок, расположенный сразу за местом, соответствующим 3'-концу мРНК, т. е. за сайтом полиаденилирования, тоже связывает вновь синтезированную РНК с той же эффективностью. Следовательно, он, так же как и участок собственно гена,

прочитывается РНК-полимеразой. Контролем служит участок генома перед сайтом кэпирования, который совсем не связывает меченую РНК.

Лишь примерно через 1 т. п. н. располагается участок, в котором связывание меченой РНК на единицу длины ДНК падает в 3 раза, а следующие за ним отрезки вообще не гибридизуются с РНК. Более подробный анализ области с пониженным связыванием РНК показывает, что синтез РНК обрывается не в одной определенной точке, но затухает в пределах отрезка длиной около 1 т. п. и. Для разных генов длина этой зоны терминации и ее расстояние от сайта полиаденилирования сильно варьирует, но принципиальная схема во всех случаях остается одной и той же.

Эксперименты с разными искусственными конструкциями показывают, что для терминации транскрипции нужно существование в геноме зоны терминации и обязательно расположенного перед нею сайта полиаденилирования. Если последний убрать, то транскрипция идет за зону терминации. В то же время зону терминации можно удалять и приближать к сайту полиаденилирования, и терминация все равно будет происходить в ее пределах.

Нуклеотидные последовательности зон терминации, прилежащих к разным генам, содержат ряд гомологичных областей, однако в настоящий момент вопрос о природе сигналов терминации остается открытым. Для этого необходимы опыты по мутагенезу в зонах терминации.

2.4. Уникальные гены и генные семейства

Литература: [85—87]

Итак, из предыдущих разделов явствует, что в состав типичного гена входят область транскрипции, состоящая из экзонов, интронов и зоны терминации транскрипции, а также различные регуляторные последовательности (энхансеры, сайленсеры и др.), которые чаще всего концентри-

руются недалеко от точки старта транскрипции, но могут располагаться и в области транскрипции, и на больших расстояниях перед нею (дальние энхансеры), и после нее (см. рис. 10). Поэтому, хотя область транскрипции, особенно если считать ее от старта до сайта полиаденилирования, легко ограничить, то всю область гена со всеми контрольными областями определить много труднее. Наиболее убедительным тестом являются опыты с трансгенными животными. Если работа пересаженного гена абсолютно не отличается от работы нормального гена, можно думать, что все его контрольные элементы вошли в состав пересаженного фрагмента ДНК.

Даже такой «полный» ген, как правило, не соседствует непосредственно со следующим геном, но погружен в последовательности ДНК, не выполняющие каких-либо очевидных функций, во всяком случае кодирующих. Гены в геноме, таким образом, напоминают острова архипелага в море неактивных, по крайней мере на первый взгляд, последовательностей.

Иногда гены являются действительно уникальными, т. е. представленными всего одной копией на гаплоидный набор ДНК. Однако это не самый частый случай. Чаше, особенно для высших эукариот, гены представлены не одиночными копиями, но семействами нескольких, сходных между собою генов, выполняющих сходные функции, т. е. кодирующих родственные друг другу белки.

Есть разные типы семейств генов. Одни из них — тандемно повторенные гены. В этом случае все представители семейства одинаковы по структуре и кодируют одни и те же продукты. Сюда относятся гены для рибосомной РНК, 5S РНК, гены для гистонов и некоторые другие. Так, например, в случае гистоновых генов в определенном участке хромосомы многократно (десятки или сотни раз в зависимости от вида) повторяется одинаковый блок, состоящий из пяти генов, разделенных спейсерами, содержащими контрольные элементы. Повторяющиеся единицы

следуют непосредственно одна за другой без каких-либо вкраплений другой ДНК. Так устроены гены, продукты которых должны нарабатываться в больших количествах в короткие промежутки времени (рис. 11).

Другой тип семейства — семейство, в котором его представители находятся близко друг от друга в одной области генома, но не образуют гомогенных повторяющихся единиц. Это наиболее распространенный тип организации семейств генов. Классический пример — β -глобиновые гены генома человека (см. рис. 11). В области размером ~ 60 т. п. н. хромосомы 11 располагается 7 копий семейства β -глобиновых генов. Все они несколько отличаются друг от друга и имеют разные названия: ϵ , γ^A , γ^B , δ и β . Пять копий функциональны и экспрессируются на разных стадиях онтогенеза. Две копии представляют собою псевдогены, или испорченные гены, в которых произошли мутации, не совместимые с функционированием гена.

Очевидно, все гены β -глобинового семейства произошли путем дупликации одного родоначального β -глобинового гена. В ходе дальнейшей эволюции они приобрели регуляторные последовательности, обеспечивающие их работу на определенной стадии развития: ϵ — в раннем эмбриогенезе, γ — на более поздних его стадиях, β — в период постнатального развития. Произошло и некоторое изменение их структуры, причем экзоны изменились меньше, чем интроны. В тех генах, которые в ходе эволюции инактивировались, произошло быстрое накопление изменений, образовались псевдогены.

Кроме семейства β -глобиновых генов существует семейство α -глобиновых генов. Они расположены на другой хромосоме и отличаются по структуре, но тем не менее имеют гомологию с β -глобиновыми генами. Очевидно, на еще более ранней стадии эволюции из одного предкового глобинового гена образовались путем дупликации два (α и β), которые затем в результате транслокации

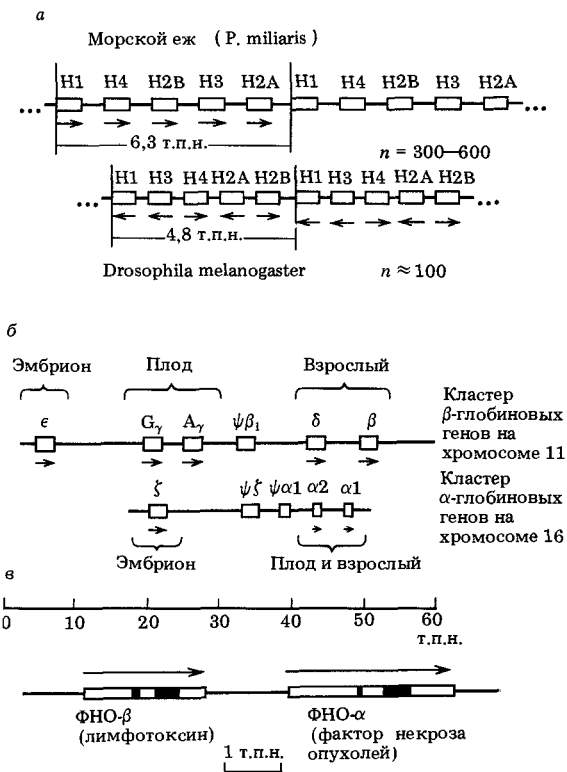


Рис. 11. Примеры генных семейств

а гистоновые гены морского ежа и дрозофилы. Гистоновые гены пример кластера многократно повторяющихся (n) одинаковых генетических единиц; **б** β -глобиновый и α -глобиновый кластеры человека, расположенные на двух разных хромосомах. В них наряду с активными генами присутствуют псевдогены (ψ). Разные гены активны на разных этапах онтогенеза; **в** — небольшой кластер из двух генов фактора некроза опухолей (ФНО) человека. Гены выделены прямоугольниками (в случае ФНО указаны интроны черные прямоугольники). Стрелки указывают направление транскрипции (по результатам, полученным М. Бирнстилом, Т. Маниатисом, нашей лабораторией и др.)

(перемещения) генетического материала оказались в двух разных хромосомах. Там они еще несколько раз дуплицировались, что привело к созданию двух семейств. Вместе они образуют суперсемейство.

Третий тип семейств генов характеризуется тем, что его члены вообще не образуют скоплений, а оказываются разбросанными по геному. Очевидно, в этом случае в промежутке между дупликациями происходили транслокации генов в новые места генома. Сюда, например, относятся представители семейства актиновых генов у дрозофилы.

Семейства генов бывают большие и малые. Так, например, семейство генов для фактора некроза опухолей (ФНО) состоит всего из двух генов — ФНО- α и ФНО- β . Они расположены в геноме рядом с интервалом всего в 1 т. п. н. (см. рис. 11).

В то же время суперсемейство генов иммуноглобулинового типа состоит из нескольких семейств (собственно иммуноглобулиновые, гистосовместимости, Т-клеточных рецепторов и др.) и содержат тысячи копий, занимая огромные участки генома, в миллионы пар нуклеотидов.

В настоящее время литература по семействам очень обширна. Подобное рассмотрение ее выходит за рамки книги. Отмечу лишь, что принцип организации генов в семейства указывает на исключительно важную роль процесса дупликации генов в ходе эволюции. Это один из важнейших путей образования нового генетического материала.

2.5. Резюме

Итак, активные исследования, проводившиеся в течение последних 10 лет, пролили свет на молекулярную организацию эукариотических генов. Собственно ген или отрезок ДНК, кодирующий мРНК; состоит из трех частей — 5'-нетранслируемой зоны, кодирующего белок участка и 3'-нетранслируемой зоны. В сумме они составляют зрелую мРНК, на 5'-конце которой находится кэп, а на 3'-конце —

поли(А), синтезируемые посттранскрипционно. В геноме эта последовательность прерывается интронами, на которые обычно приходится больше материала, чем на экзоны. Экзоны и интроны составляют собственно ген в геноме. Первый экзон начинается с сайта экпирования, последний заканчивается сайтами полиаденилирования. Перед геном (за 20—30 п. н.) располагается обычно ТАТА-блок, обеспечивающий точное начало транскрипции и, вероятно, являющийся промотором. К промотору также можно отнести ССААТ-блок и ССГССС (или GGGCGG) блоки, лежащие за 60—100 п. н. от старта. За 15—25 п. н. до сайта полиаденилирования лежит ААТААА-блок, определяющий место окончания мРНК. За пределами гена лежат нетранскрибируемые области, или спейсеры. Обычно в спейсере перед геном располагаются элементы, контролирующие работу гена, энхансеры и сайленсеры. Их может быть несколько, и иногда они лежат после гена или даже внутри его, в интронах, а изредка и в экзонах. По-видимому, довольно часто энхансеры лежат на больших расстояниях от гена (несколько тысяч пар нуклеотидов). Наконец, за геном на том или ином расстоянии находится зона терминации транскрипции (см. рис. 10). Не исключено, что дальнейшее исследование откроет новые, пока не известные, функциональные элементы в эукариотических генах.

Гены эукариот бывают представлены одиночными копиями, скоплениями одинаковых генов или семействами сходных, но не идентичных генов. Число копий в семействе может варьировать от нескольких до нескольких тысяч.

Глава третья

ОРГАНИЗАЦИЯ ГЕНОВ В ХРОМОСОМЕ: СТРУКТУРА ХРОМАТИНА

У эукариот ДНК находится в специальном компартменте, в клеточном ядре, и входит в состав нуклеопротеидных комплексов с основными белками гистона. Это фундаментальное отличие эукариот от прокариот. Другое фундаментальное отличие — появление у большинства эукариот процессов дифференцировки, т. е. устойчивого выключения и включения определенных генов в разных группах клеток. Напрашивается предположение, что эти процессы связаны, и переход гена в активное или неактивное состояние зависит от структурных изменений в ядерных нуклеопротеидах или хроматине. Однако, прежде чем останавливаться на этих переходах, надо остановиться на основных принципах организации хроматина.

3.1. Составные компоненты хроматина

Литература: [88]

Основными компонентами хроматина являются ДНК, гистоны и негистоновые белки. Общее количество ДНК, приходящееся на гаплоидный хромосомный набор человека, $3 \cdot 10^9$ п. н., что составляет около 1 м по длине. На одну хромосому приходится в среднем 4 см ДНК ($1,2 \cdot 10^8$ п. н.). В то же время длина метафазной хромосомы, т. е. максимально компактного дезоксирибонуклеопротеинового

(ДНП) комплекса составляет 4 мкм. Следовательно, ДНК в метафазной хромосоме компактизована в 10^4 раз. Чтобы понять строение хроматина, удобно рассмотреть основные уровни организации ДНК и ее компактизации в хромосоме.

Компактизация ДНК определяется в значительной мере ее взаимодействием с основными белками гистонами. Комплексы ДНК с гистонами нерастворимы при физиологических концентрациях солей. Для растворения хроматина необходимо либо снижение ионной силы до 0,001—0,01, либо, наоборот, использование концентрированных солевых растворов (~ 1 М). В последнем случае, однако, солевые связи между ДНК и гистонами разрушаются, и ДНП диссоциирует на составные части.

Имеется пять основных классов гистонов, обозначаемых как Н1 (содержит очень много лизиновых остатков), Н2а, Н2b (умеренно обогащенных лизином), Н3 и Н4 (гистоны, обогащенные аргинином). Некоторые классы гистонов включают подклассы. Следует отметить чрезвычайную эволюционную консервативность гистонов, особенно Н3 и Н4. Например, гистоны Н3 из телят и гороха отличаются лишь одной аминокислотной заменой. Это говорит о точном соответствии структуры всей молекулы выполняемым гистонами функциям. Гистоны находятся в стехиометрических соотношениях с ДНК и между собою. В первом приближении на одну весовую единицу ДНК приходится немногим более одной весовой единицы суммарного гистона. Молярные отношения между гистонами Н1 : Н2а : Н2b : Н3 : Н4 составляют 1 : 2 : 2 : 2 : 2. Однако поскольку молекулярная масса гистона Н1 (21 кДа) выше, чем у остальных (10—15 кДа), то в весовом отношении содержание разных гистонов примерно совпадает.

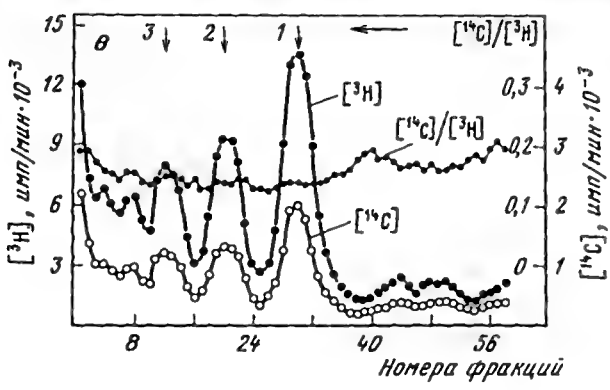
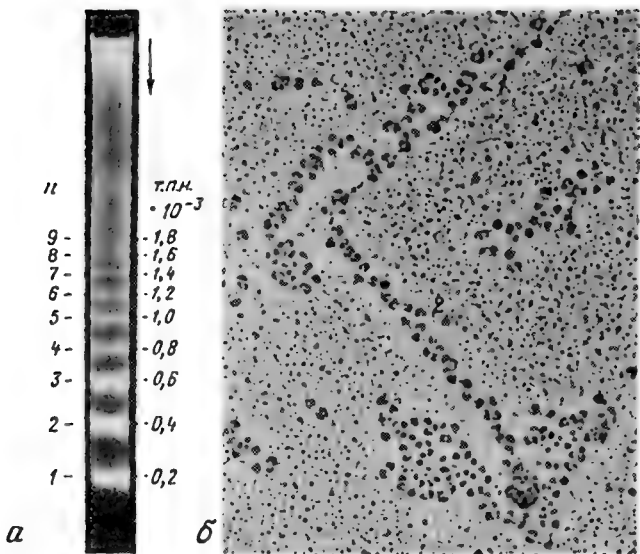
Помимо гистонов, хроматин содержит большое количество так называемых негистоновых белков, т. е. белков, не являющихся гистонами. Сюда относятся разные ферменты, участвующие в репликации, транскрипции и других

процессах, регуляторные белки и т. д. Эта очень гетерогенная группа белков пока плохо охарактеризована. Речь о них пойдет ниже.

Из-за трудности поддерживать нативные ДНК хроматина в растворимом состоянии исследования его структуры в течение долгого времени топтались на одном месте, пока в 1974—1975 гг. не были открыты нуклеосомы.

3.2. Первый уровень организации хроматина — 100 Å-нуклеосомная фибрилла

Открытие нуклеосом [89—92]. В 1973 г. Д. Хьюиш и Л. Буржойн (Австралия), переваривая хроматин эндогенной нуклеазой ядер при низкой ионной силе в присутствии ионов Mg^{2+} и Ca^{2+} и затем исследуя размеры получаемых фрагментов с помощью электрофореза в полиакриламидном геле, сделали наблюдение огромной важности. Оказалось, что получаемые при этом фрагменты ДНК образуют при электрофорезе серию дискретных полос с размерами, кратными примерно 200 п. н. Тем самым авторы открыли существование в хроматине дискретных повторяющихся единиц, выщепляемых нуклеазой (рис. 12). Вслед за тем К. Ван Хольде (США) расфракционировал ядерный экстракт, подвергнутый нуклеазному гидролизу ультрацентрифугированием в сахарозном градиенте, и выделил частицы с коэффициентом седиментации около 11S, равно как и серию более крупных частиц, по своим седиментационным характеристикам напоминавшим олигомеры 11S-частиц. Одновременно А. Олинс и Д. Олинс (США), исследуя в электронном микроскопе препараты хроматина, обнаружили, что в определенных условиях хроматиновые фибриллы выглядят как тонкие нити с сидящими на них бусинами ~ 10 нм в диаметре (см. рис. 12). Наконец, Р. Корнберг (Кембридж, Великобритания) проанализировал состав частиц и показал, что каждая частица содержит отрезок ДНК длиной 150—200 п. н. и 8 молекул гистонов:



по две молекулы гистонов H2a, H2b, H3 и H4. Эта частица была позднее названа «нуклеосомой». Нуклеосомы можно получить, переваривая хроматин не только эндогенной нуклеазой, но и легко доступной нуклеазой стафилококков. Позднее нуклеосомы получали и с помощью других нуклеаз, в частности с помощью ДНКазы I и ДНКазы II.

Нуклеосомы и гистон H1^{1*} [93—95]. После открытия нуклеосом на повестку дня встал вопрос о месте гистона H1 в структуре нуклеосом.

Этот вопрос к тому моменту интенсивно исследовался в нашей лаборатории. Дело в том, что еще в 1967 г. мы с Ю. В. Ильиным обнаружили, что гистон H1 резко отличается от остальных по своему влиянию на свойства ДНП. В этой работе проводилось ступенчатое удаление гистонов при постепенном повышении солевой концентрации в экстрагирующих растворах. Оказалось, что уже в 0,6 М NaCl ДНП переходит в раствор, хотя при этом удаляется лишь небольшая часть всех гистонов, а именно гистон H1. Более того, освобожденный от гистона H1 ДНП (обозначенный как ДНП_{0,6}) становится растворимым и при физиологических концентрациях солей (в 0,14 М NaCl). Однако ДНП_{0,6} вновь становился нерастворимым, агрегировал, если к нему добавляли гистон H1 в эквимольном соотношении и снижали концентрацию NaCl с 0,6 М до 0,14 М.

Рис. 12. Разные способы выявления нуклеосом

а — электрофорез в полиакриламидном геле ДНК, выделенной из хроматина клеток асцитного рака Эрлиха после его гидролиза микрококковой нуклеазой. Видна лестница из дискретных фрагментов с размерами, кратными 200 п. н.; *б* — электронная микроскопия препаратов хроматина клеток асцитного рака Эрлиха после мягкой нуклеазной обработки. Препараты получены методом напыления. Видны вытянутые фибриллы с нуклеосомами (1) и фибриллы в форме зигзага (2). Размер нуклеосом составляет ~100 Å в диаметре; *в* — разделение моно- и олигонуклеосом ультрацентрифугированием в сахарозном градиенте. Клетки асцитного рака Эрлиха метили [³H]-тимидином (ДНК) и [¹⁴C]-аминокислотами (белки), выделяли хроматин и после обработки микрококковой нуклеазой ультрацентрифугировали материал в сахарозном градиенте. Хорошо видны пики моно- (1), ди- (2) и три- (3) нуклеосом (по результатам, полученным В. В. Бакаевым и соавт.)

Действие гистона Н1 было специфическим. Требовалось добавить гораздо большее количество какого-либо другого гистона, чтобы получить тот же самый эффект. Был сделан вывод, что гистон Н1 играет особую роль в организации структуры хроматина, вызывая его резкую конденсацию, особенно при физиологических солевых концентрациях. Эти результаты нашли потом многочисленные подтверждения в работах других авторов, использовавших различные физические методы для регистрации конденсации хроматина.

Естественно, что после открытия нуклеосом мы вновь вернулись к вопросу о месте гистона Н1 в структуре хроматина. В. В. Бакаев и А. Я. Варшавский проверили, существуют ли нуклеосомы в препаратах хроматина, лишенных гистона Н1, т. е. в ДНП_{0,6}, и обнаружили их там. Далее они разработали новый подход к фракционированию нуклеосом — электрофорез в полиакриламидном или агарозном геле в неденатурирующих условиях при низкой ионной силе. При агарозном электрофорезе хорошо разделяются моно-, ди- и тринуклеосомы, гораздо лучше, чем при ультрацентрифугировании в сахарозном градиенте. Более того, каждый из компонентов, в свою очередь, дает по несколько полос (рис. 13).

Чтобы определить, за счет чего возникают эти дополнительные полосы, был разработан вариант двумерного электрофореза. В первом направлении разделение велось, как описано выше, а затем гель обрабатывали детергентом, додецилсульфатом натрия (ДСН), разрушающим нуклеопротеидные комплексы; во втором направлении разгонка велась в присутствии ДСН. После окончания электрофореза определялось положение ДНК и белка. Оказалось, что наиболее быстро бегущая полоса моонуклеосом, названная МН-1 (моонуклеосома 1), содержит ДНК длиной 145 п. н. и по две молекулы гистонов Н2а, Н2б, Н3 и Н4, т. е. гистоновый октамер. Следующие компоненты — МН-2 и МН-3 — содержат ДНК длиной 165 и 195 п. н. и все

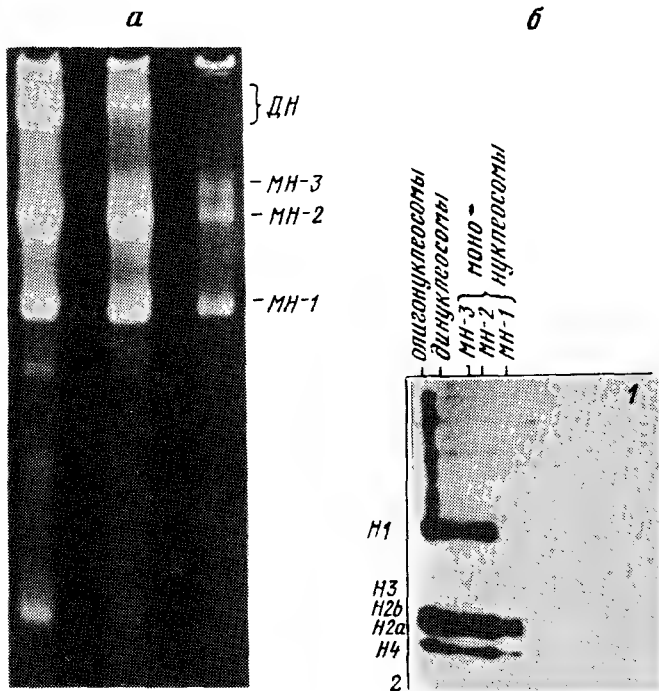


Рис. 13. Выявление субфракций моноклеосом с помощью электрофореза в неденатурирующих условиях

a - разделение моноклеосом на три фракции путем электрофореза гидролизата хроматина микрококковой нуклеазой в полиакриламидном геле в 1 мМ ЭДТА, рН 7,8, мн — моноклеосомы, дн — динуклеосомы; *б* — анализ гистонов состава моноклеосом с помощью двумерного электрофореза. Клетки асцитного рака Эрлиха метили $[^{14}\text{C}]$ -аминокислотами. Гидролизат хроматина разделяли в направлении 1 в неденатурирующих условиях, а в направлении 2 — в присутствии додецилсульфата натрия. Белки выделяли по метке с помощью флюорографии. Видно, что МН-1 не содержат гистона Н1, а МН-2 и МН-3 содержат (по результатам, полученным В. В. Бакаевым и соавт.)

гистоны, включая и гистон H1. Таким образом, нуклеосома может либо содержать, либо не содержать гистон H1, но в последнем случае размеры ДНК оказываются меньшими по сравнению с полным повторяющимся элементом ДНК (см. рис. 13).

В опытах других авторов было найдено, что 145 п. н. — это минимальный размер нуклеосомной ДНК. При дальнейшем переваривании нуклеазами происходит разрушение нуклеосом. Поэтому частицы с ДНК 145 п. н. были названы «сердцевинами нуклеосом» («core particles»). Очевидно, что они содержат только гистоиновый октамер (т. е. 8 молекул гистонов H2a, H2b, H3 и H4). Они же соответствуют бусинам на электронных микрофотографиях. В их состав гистон H1 не входит.

Частицы размером ~ 195 п. н. соответствуют полным нуклеосомам, т. е. они включают в свой состав не только сердцевину, но и область между бусинами, линкер (соединитель), и в них уже присутствует гистон H1 (одна молекула на нуклеосому), который, очевидно, взаимодействует с областью линкера. Таким образом, гистон H1 действительно занимает особое структурное положение в нуклеосоме, не входя непосредственно в сердцевину последней. Размеры полной нуклеосомы могут варьировать у разных видов и в разных тканях.

Структура нуклеосомы^{2*} [96—101]. Основные данные о строении нуклеосомы получены с помощью четырех методических подходов: 1) рентгеноструктурного анализа относительно низкого разрешения кристаллов сердцевин нуклеосом (проведенного А. Ключом, Великобритания); 2) изучения контактов ДНК с гистонами с помощью методов пришивки к ДНК, разработанных и использованных А. Д. Мирзабековым и сотр.; 3) анализа гистоновых контактов с помощью обычных методов сшивки белков бифункциональными агентами и, наконец, 4) детального изучения характера переваривания ДНП нуклеосом различными нуклеазами, прежде всего ДНКазой I. Подходы 1

и 4 позволили понять расположение ДНК в нуклеосоме. Согласно данным рентгеноструктурного анализа, ДНК наматывается на поверхность гистоновой глобулы, октамера, образуя примерно 1,5 негативных супервитка в составе сердцевинной частицы. Данные рентгеноструктурного анализа объясняют наблюдения по характеру переваривания ДНК сердцевины ДНКазой I, вносящей в ДНК одноцепочечные разрывы. Оказалось, что ДНКаза I разрезает ДНК в составе нуклеосом по местам, расположенным на расстоянии 10 п. н. друг от друга, причем две цепи ДНК рассекаются не в одних и тех же точках, но со сдвигом. Это легко объясняется, если допустить, что при намотке на октамер ДНК взаимодействует с последним одной своей стороной и что шаг двойной спирали ДНК в нуклеосоме составляет 10 п. н. Тогда через каждые 10 нуклеотидов одна из цепей ДНК будет занимать наружное положение, удобное для атаки ДНКазой I.

Локализация гистонов относительно ДНК была установлена в работах А. Д. Мирзабекова и сотр. Для этого изолированные сердцевины или полные нуклеосомы обрабатывали диметилсульфатом в условиях, когда он реагировал с небольшим числом пуриновых оснований ДНК. При последующей обработке эти метилированные пурины отщеплялись, и освободившаяся альдегидная группа дезоксирибозы взаимодействовала с основными аминокислотами белка. ДНК при этом расщеплялась. В результате образовывался комплекс 5'-концевого фрагмента ДНК с белком, пришитым к его 3'-концу. Полученные ковалентно связанные комплексы ДНК и индивидуальных гистонов разделяли электрофорезом в полиакриламидном геле. Затем разрушали либо ДНК, либо белок и вели электрофорез в другом направлении. В результате можно было определить с высокой точностью природу гистона, вошедшего в комплекс, и длину ДНК от ее 5'-конца в нуклеосоме до места контакта с данным гистоном.

Структура нуклеосомы, полученная таким образом,

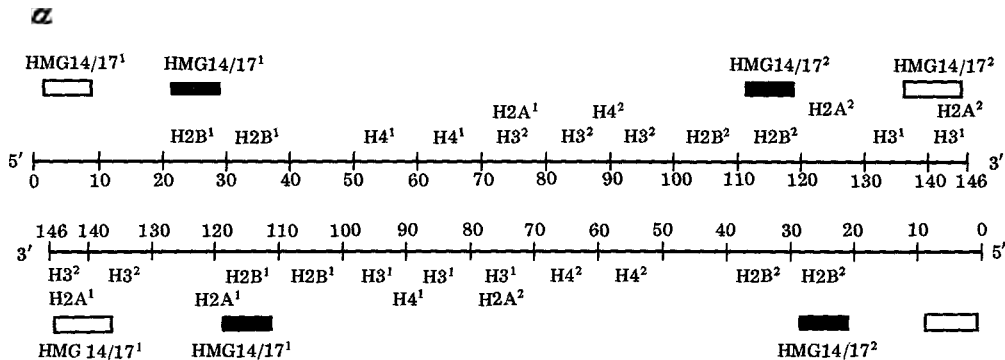
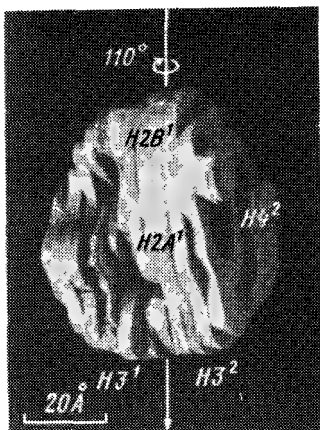


Рис. 14. Структура нуклеосомы

а — расположение контактов ДНК с различными гистонами и HMG-белками вдоль цепи ДНК в сердцевине нуклеосомы по данным анализа местоположений ДНК-белковых сшивок, индуцированных диметилсульфатом (по результатам, полученным А. Д. Мирзабековым и соавт.); *б—в* — модель нуклеосомы Клуга, построенная на основании данных рентгеноструктурного анализа и результатов А. Д. Мирзабекова: *б* — белковый октамер; *в* — октамер с навивтой на него ДНК; вид под разными углами

б



в

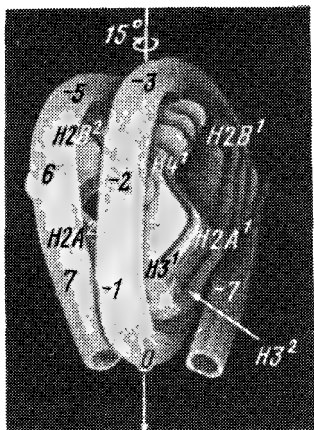


Рис. 14 (окончание)

изображена на рис. 14. Не вдаваясь в детали, отмечу, что на каждой из цепей ДНК контакты ДНК с гистонами идут с интервалами в 10 п. н. и расположены в двойной спирали напротив участков другой цепи, чувствительных к ДНКазе I. Каждый гистон образует несколько контактов с ДНК. В целом контакты гистонов H3 и H4 располагаются преимущественно в центре, а гистонов H2a и H2b — по краям нуклеосомной ДНК. Гистон H1 в основном образует наиболее периферийные контакты, захватывающие область линкера.

Сопоставив собственные данные рентгеноструктурного анализа, данные о ДНК-гистоновых контактах и менее информативные данные о гистон-гистоновых сшивках, Клуг предложил пространственную модель нуклеосомы, которая, по-видимому, не очень далека от истины. ДНК в В-форме (шаг спирали 10 п. н.) намотана на дисковидный октамер, в котором для этого имеются соответствующие борозды.

В центральной части ДНК находятся гистоны H3 и H4, а на периферии — гистоны H2a и H2b. Структура обладает симметрией 2-го порядка (см. рис. 14). Нуклеосомный диск имеет 110 Å в диаметре (именно по его окружности намотана ДНК) и 57 Å в высоту.

100 Å-нуклеосомная фибрилла. При очень низкой ионной силе и в отсутствие двухвалентных катионов хроматин выглядит как фибриллы с бусинами, находящиеся на расстоянии 100—200 Å. Часто бусины располагаются в форме зигзага. Так же выглядит хроматин, лишенный гистона H1, даже и при более высоких концентрациях солей.

При повышении ионной силы в препаратах, содержащих H1, происходит структурный переход, заключающийся в формировании равномерной фибриллы диаметром 100 Å, в которой нуклеосомы тесно прилегают друг к другу, и линкеры практически неразличимы. Вероятно, октамеры, слипаясь своими свободными от ДНК поверхностями, образуют сплошной белковый тяж, на который намотана ДНК, в том числе и линкерная. Таким образом, на каждую полную нуклеосому придется по два витка ДНК. По всей вероятности, *in vivo* нуклеосомы в основном образуют такую 100 Å-фибриллу.

В лаборатории А. Д. Мирзабекова с помощью описанных выше методов изучалась организация не только нуклеосом, но и спейсера. Кроме гистона H1, в его упаковке принимает участие гистон H3, а иногда и гистон H2b. Регулярное расположение сердцевин нуклеосомы в спейсере, при котором размеры его всегда кратны 10 п. н., обеспечивает образование непрерывной суперспирали ДНК.

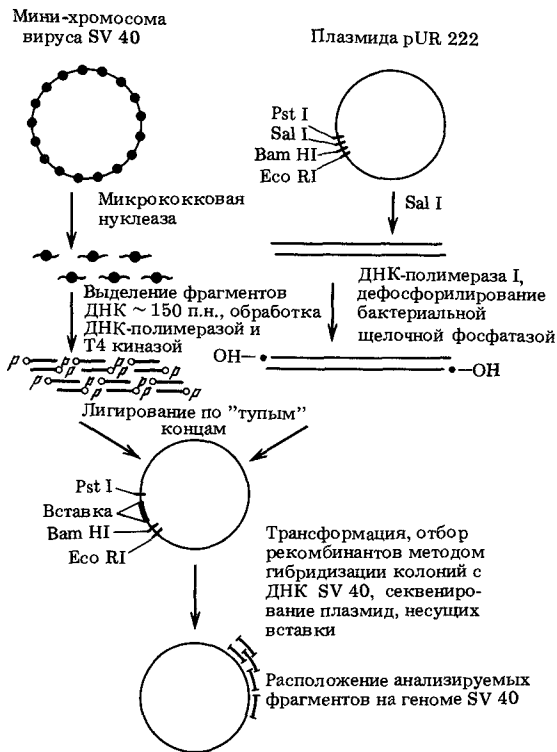
Поскольку диаметр ДНК составляет 20 Å то, следовательно, диаметр 100 Å-фибриллы превышает его в 5 раз. В то же время линейные размеры структуры сокращаются в 7 раз, т. е. происходит 7-кратная компактизация ДНК.

Фазирование нуклеосом^{1*} [102—107]. Важен и широко дискутируется вопрос о том, локализованы ли нуклеосомы в определенных местах ДНК или они распределяются слу-

чайным образом, если же не случайно, то какие законы управляют их связыванием с ДНК. По данному вопросу проведено много исследований, но результаты остаются противоречивыми, и, по-видимому, ответ не является однозначным.

Одним из экспериментальных подходов к изучению вопроса был разработан нами с С. А. Недоспасовым и К. Ву (США). Это метод анализа локализации разрыва в ДНК с помощью гибридизационного картирования. В западной литературе метод называют «indirect end labeling» (непрямая метка концов). Хроматин подвергают ограниченному гидролизу нуклеазой. После этого выделяют из него ДНК и обрабатывают рестриктазой, расщепляющей ДНК недалеко от той области генома, которую исследуют. ДНК подвергают электрофорезу, переносят на нитроцеллюлозный фильтр и гибридизуют с меченой пробой. Эта проба представляет собою небольшой рестриктный фрагмент (длиной 200—400 п. н.), прямо прилежащий в геноме к вышеупомянутому рестриктному сайту, рядом с которым располагается исследуемая зона. Определив далее размеры фрагментов, гибридизующихся с пробой, можно точно локализовать места, по которым нуклеаза расщепляет ДНК в составе хроматина (рис. 15).

Недостатком метода является, однако, то, что и свободная ДНК расщепляется нуклеазами неравномерно, и в свободной ДНК есть точки предпочтительной первичной атаки нуклеазами, причем ни одна из известных пока нуклеаз не является исключением. Поэтому в опытах по гибридизационному картированию разрывов надо всегда тщательно сравнивать результаты, полученные на хроматине и на свободной ДНК. Иногда они совпадают, иногда — нет. Только в последнем случае можно делать вывод, что эти разрывы отражают организацию хроматина. Сейчас разработаны новые методы химического расщепления ДНК, которые менее чувствительны к ее структуре и могут быть использованы более успешно.



опытов была составлена карта разрывов микрококковой нуклеазой ДНК SV40 в составе мини-хромосомы (МХ) или свободной ДНК в растворе (СД). Видно частичное, но не полное перекрывание этих карт; б — метод молекулярного клонирования нуклеосомных сердцевин. Таким образом было проанализировано около 300 нуклеосом из мини-хромосомы SV40 (по результатам, полученным С. А. Недоспасовым, А. С. Шаховым и автором).

Другой методический подход, разработанный в нашей лаборатории С. А. Недоспасовым и А. Н. Шаховым, приложим к участкам ДНК с известной нуклеотидной последовательностью. Он состоит в анализе клонированных нуклеосомных фрагментов ДНК. Опыты велись, как и в первом случае, на мини-хромосоме SV40. Ее подвергали расщеплению микрококковой нуклеазой и затем убирали концы ДНК с помощью экзонуклеазы и нуклеазы S1, с тем чтобы получить только сердцевины нуклеосом. Выделенную ДНК клонировали в плазмиде и получали большое число клонов. Каждый клон содержал в виде вставки отрезок ДНК длиной около 145 п. н., соответствующий той или иной нуклеосоме. Далее можно либо определить первичную структуру большого числа вставок, либо предварительно с помощью гибридизации отобрать колонии, соответствующие той или иной области генома, и изучать только их (см. рис. 15). Поскольку нуклеотидная последовательность генома SV40 известна, то достаточно выяснить распределение во вставке только одного нуклеотида. Так, мы изучали распределение по длине ДНК только одного Т, а затем по соответствующим таблицам находили место генома, которому соответствует данный клон.

Результаты наших опытов с использованием обоих подходов показали, что разные области генома SV40 различаются по своим свойствам. В некоторых из них имеются четко выраженные предпочтительные места локализации нуклеосом. В других областях, наоборот, нуклеосомы располагаются более или менее случайно. В области, где положение нуклеосом наиболее фиксировано, можно тем не менее выявить не один, а три основных варианта их расположения вдоль ДНК, т. е. и здесь ситуация не полностью однозначна.

Сходные работы были выполнены в лаборатории Г. Цахау (ФРГ) на различных сателлитных ДНК. Было показано, что ДНК «фазируется», но число возможных рамок достаточно велико. В наиболее хорошо изученной α -сател-

литной ДНК зеленой мартышки число рамок равно восьми. Таким образом, нуклеосомы могут образовываться в разных местах ДНК. Есть, однако, и случаи, когда положение нуклеосом в определенных участках ДНК в хроматине более или менее однозначно, например в спейсере некоторых гистоновых генов.

Что же в таком случае определяет положение нуклеосом? Таких факторов может быть несколько.

Один из таких факторов — негистоновые белки, узнающие и прочно связывающиеся с определенными последовательностями ДНК. Например, в центромерах у дрожжей, т. е. в областях хромосом, с которыми при митозе взаимодействуют нити веретена, располагаются белки, прочно связывающиеся с отрезком ДНК около 150 п. н. длиной. Этот участок ДНК полностью защищен от действия нуклеаз. Непосредственно рядом с ним, в обе стороны от защищенного участка, нуклеосомы строго фазированы, занимая лишь одно положение. Этот феномен можно обозначить как феномен «стенки». Чем ближе к стенке, тем более фазированы нуклеосомы.

Другим фактором, определяющим положение нуклеосом, является степень гибкости ДНК, которая, в свою очередь, является функцией от нуклеотидной последовательности. Имеется много расчетных работ по гибкости ДНК, но они пока носят гипотетический характер. Постепенно накапливаются и более строгие данные, вытекающие из анализа трехмерной структуры ДНК. Места, где ДНК гнется сильнее, вероятно, будут предпочтительны для формирования нуклеосом. В то же время есть участки ДНК, которые вообще не способны образовывать нуклеосомы. Так, ДНК типа поли(dA)/поли(dT) или ДНК в Z-форме не образуют нуклеосом.

Если в ДНК встречаются подобные типы последовательностей, то они будут определять фазирование нуклеосом в этой области и отчасти в прилежащих. При реконструкции нуклеосом из ДНК и гистонов в таких областях

воссоздается исходная организация. В тех же местах фибриллы, где первый и второй факторы фазирования отсутствуют, можно ожидать более или менее случайное распределение нуклеосом вдоль ДНК.

В настоящее время нет никаких указаний на функциональное значение фазирования нуклеосом. Возможно, что характер их расположения вдоль ДНК не имеет функционального значения. Это, конечно, не касается участков хроматина, которые вообще не содержат нуклеосом и о которых пойдет речь в гл. 4.

3.3^{1*2*}. Второй уровень организации хроматина: соленоид или нуклеомер

Литература: [108—113]

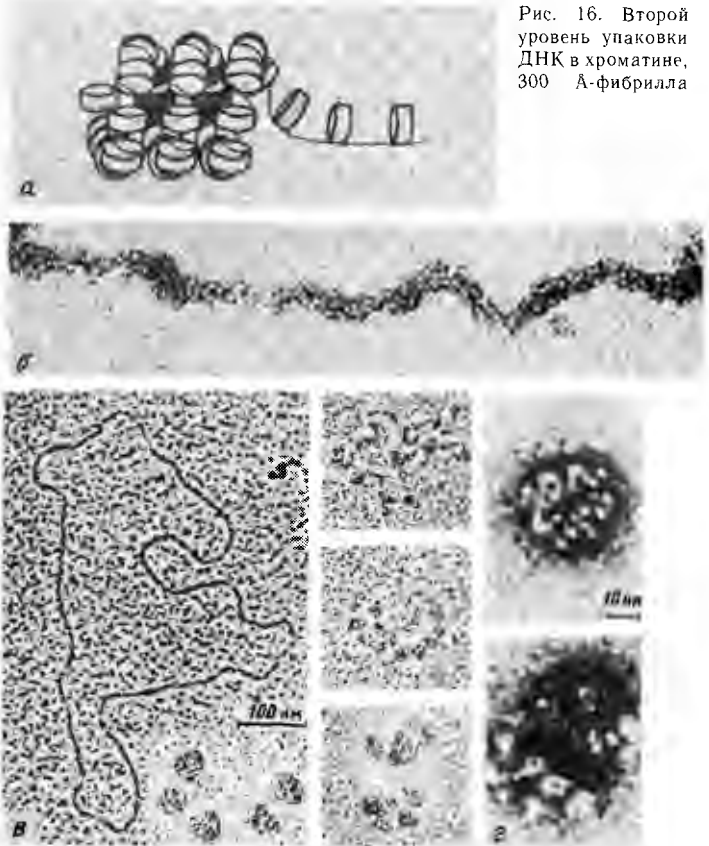
Еще в ранних электронно-микроскопических работах Г. Риса (США) было установлено, что в ядрах ДНК входит в основном в состав фибрилл с диаметром 250—300 Å, что, очевидно, существенно превышает диаметр нуклеосомной фибриллы. Позднее Ю. С. Ченцов (МГУ) показал, что при низкой ионной силе в отсутствие Mg^{2+} в ядрах с помощью электронной микроскопии выявляются 100 Å-фибриллы, но при увеличении ионной силы или добавлении ионов Mg^{2+} они переходят в более толстые, 300 Å-фибриллы, состоящие из периодических утолщений и перетяжек. Подобные структурные переходы удается наблюдать и в модельных опытах в растворе. А. Круг (Великобритания) провел электронную микроскопию 300 Å-фибрилл, полученных из раствора, и показал, что она имеет сравнительно регулярную организацию, образуя соленоид. На один шаг соленоида приходится в среднем 6 нуклеосом, что дает при их плотной упаковке диаметр 300 Å и шаг спирали 100 Å (рис. 16).

Попытки реконструировать структуру 300 Å-фибриллы на основании электронно-микроскопического изучения хро-

матина внутри клеток были предприняты Ю. С. Ченцовым. Он пришел к выводу о неравномерности диаметра фибриллы по ее длине и развил представления, согласно которым она состоит из чередующихся гранул (300 Å в диаметре) и более тонких соединительных участков. Гранулы были названы нуклеомерами. Подобные гранулы были затем описаны на Западе, только под другим термином «super-beads». На ранних стадиях нуклеазного гидролиза хроматина наблюдали обогащение экстракта олигонуклеосомами, содержащими по 7—8 нуклеосом (нуклеомеры?), но эти результаты не были достаточно воспроизводимыми. Как бы то ни было, в настоящее время вопрос о деталях строения соленоида, т. е. о втором уровне упаковки ДНК в хроматине, остается открытым.

Если принять модель регулярного соленоида, это даст степень снижения линейных размеров хромосомной фибриллы в 6 раз по сравнению со 100 Å-нуклеосомной фибриллой, а по сравнению со свободной ДНК — примерно в 40 раз. Хотя детали строения соленоида не установлены, ясно, с какими белками связано его образование. 300 Å-фибрилла распадается, коль скоро из хроматина удаляется тем или иным способом гистон H1, и ее нельзя восстановить ни при каких концентрациях солей в растворе. Как отмечалось выше, Ю. В. Ильин в нашей лаборатории в свое время показал решающую роль гистона H1 в конденсации хроматина. Очевидно, что эта конденсация зависит от перехода 100 Å-фибриллы в 300 Å, причем последняя уже, как, правило, нерастворима в водных растворах, давая преципитат. В более поздних работах нашей лаборатории зависимость конденсации хроматина от присутствия гистона H1 была продемонстрирована на примере мини-хромосомы SV40. В присутствии H1 они выглядели при электронной микроскопии как компактные частицы ~300 Å в диаметре. Удаление гистона H1 вело к разворачиванию структуры и появлению четко различимых нуклеосом, связанных линкерной ДНК. Их число равно 22—24 на мини-хромосому (см. рис. 16).

Рис. 16. Второй уровень упаковки ДНК в хроматине, 300 А-фибрилла



а — возможная упаковка нуклеосомной фибриллы в соленион. Диски соответствуют отдельным нуклеосомам (Модели А Ворсела и А Клуга), б — электронная микроскопия 300 А-фибриллы видно, что она состоит из нуклеосом (по результатам, полученным Б Хамкало), в — электронно-микроскопическое изучение стадий компактизации ДНК SV40 в мини-хромосому. По часовой стрелке свободная релаксированная ДНК, мини-хромосома типа «бусин на нити», 100 А фибрилла, мини-хромосома, состоящая из больших гранул типа нуклеомеров, мини хромосома в компактной форме (диаметр 300 А, соответствует по степени компактизации

Каким образом гистон Н1 вызывает переход из нуклеосомной фибриллы в соленоид, не известно. Предполагается, что молекулы гистона Н1, лежащие в разных витках соленоида, взаимодействуют между собою, вызывая стягивание витков. Другое предположение состоит в том, что одна молекула Н1 может взаимодействовать с двумя участками ДНК, расположенными в соседних витках. Большой интерес представляют опыты Дж. Томас (Великобритания), которая установила упорядоченное расположение гистона Н1 вдоль нуклеосомной фибриллы. При проведении химической реакции с реагентами, сшивающими между собою белки, и последующем анализе продуктов реакции, было установлено, что две молекулы гистона Н1 всегда сшиваются таким образом, что аминоконец (голова) одной молекулы соединяется с карбоксильным концом (хвост) другой. Комплексы голова—голова и хвост—хвост не образовывались. Таким образом, гистоны Н1 расположены одинаковым образом вдоль нуклеосомной нити.

Было показано, что гистон Н1 содержит гидрофобную среднюю часть и богатые лизином N- и C- концы, связывающиеся с ДНК. Весьма вероятно, что именно взаимодействие больших гидрофобных блоков гистонов Н1 между собою стягивает соседние витки соленоида.

По всей вероятности, расположение витков в соленоиде не связано с последовательностями ДНК, входящими в его состав, т. е. этот уровень организации хроматина безразличен к последовательностям ДНК. Последние могут, однако, оказывать влияние на структуру соленоида через «фазирование» нуклеосом. Нерегулярности в соленоиде могут быть отражением нерегулярности в расположении нуклеосом вдоль цепи ДНК. Вопрос этот, однако, нуждается в специальном изучении.

300 Å фибрилле) ЭМ выполнена после напыления. Образование компактных структур полностью зависит от наличия гистона Н1, с компактная (сверху) и раскрытая (внизу) формы мини хромосомы SV40 при высоком разрешении ЭМ выполнена после негативного контраста (по результатам, полученным В. В. Бакаевым, С. А. Недоспасовым и соавт.)

Вероятно, соленоидная (или нуклеомерная) упаковка характерна для неактивного, не работающего хроматина. При переходе его в транскрипционно-активное состояние соленоид должен разрушаться, исходя хотя бы из топологических соображений.

3.4^{1*}. Третий уровень организации хроматина: петли

Открытие ядерного скелета (остова) и прикрепления к нему петель ДНК^{1*} [114—124]. Третий уровень компактизации ДНК в хроматине определяется дальнейшей укладкой 300 Å-фибриллы в петли, прикрепляющиеся своими концами к скелетным образованиям клеточного ядра или метафазных хромосом. Последние часто обозначают как ядерный матрикс и хромосомный остов соответственно.

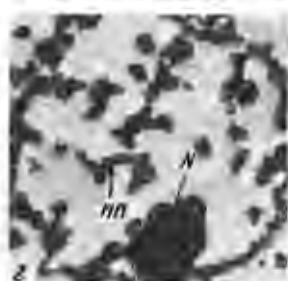
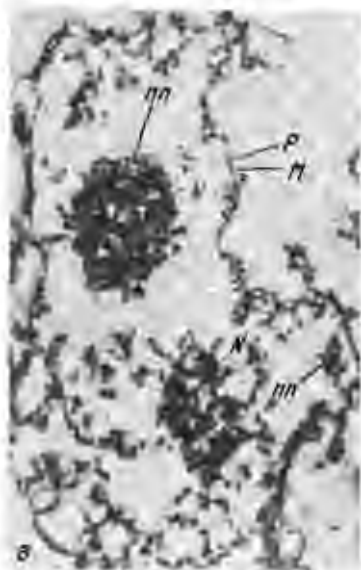
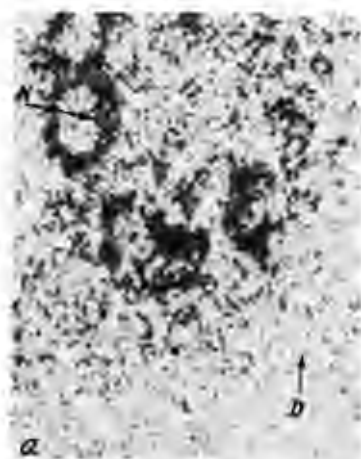
Открытие ядерного матрикса было сделано в лаборатории И. Б. Збарского. В конце 40-х—начале 50-х годов были начаты активные исследования изолированных клеточных ядер А. Мирским в США и И. Б. Збарским в СССР. Мирский впервые описал негистоновые белки ДНП. И. Б. Збарский и С. С. Дебов провели анализ материала ядер, остающегося после удаления ДНП концентрированными солевыми растворами, и открыли в составе его кислый белок, растворимый в разбавленных щелочах, и нерастворимый остаточный белок.

В 1956 г. я начал свою работу в лаборатории И. Б. Збарского (Институт морфологии животных им. А. Н. Северцова АН СССР) и занялся по его предложению более детальным цитологическим анализом процесса фракционирования ядер по Збарскому и Дебову. Было установлено, что фракция кислого белка включает в себя материал как ядрышка, так и более мелких образований, рассеянных по ядру, а также выявляемых и в метафазных хромосомах.

Затем мы с Ю. С. Ченцовым провели электронно-микроскопический анализ изолированных ядер после их

экстракции различными растворами и обработки нуклеазами (рис. 17). Наиболее интересные картины были получены после обработки ядер ДНКазой I с последующей экстракцией либо только 0,14 М NaCl, либо 0,14 М NaCl, затем 1—2 М NaCl. В первом случае в ядрах, хорошо сохранивших свою форму, хотя они и потеряли растворимые белки и часть ДНП (но не весь), выявлялись нитевидные образования диаметром 300—600 Å. Если же мы дополнительно экстрагировали ядра 1—2 М NaCl, чтобы убрать полностью гистоны, то в ядрах на срезах были видны опять-таки ядерная мембрана, ядрышки и фибриллы, но их диаметр был меньше — около 100 Å, причем они состояли из нитей и гранул несколько большего диаметра (~200 Å). В световом микроскопе места скопления этого фибриллярного компонента окрашивались на РНК. Обработка РНКазой удаляла гранулярный компонент фибрилл. Было похоже, что такие фибриллы образовались из более толстых, получаемых на предыдущем этапе экстракции. Кстати, как те, так и другие во многих случаях контактировали с ядерной оболочкой, а иногда с ядрышком. После обработки препаратов разбавленными щелочными растворами в них оставались только ядерные оболочки. Таким образом, рибонуклеопротеины клеточного ядра образуют ядрышки и фибриллярный материал, располагающийся внутри ядра. Составляющие фибриллярный компонент нити были названы нами нуклеонемами.

В той же работе мы с Ю. С. Ченцовым выдвинули гипотезу об общей структурной организации клеточного ядра, согласно которой в основе каждой хромосомы лежит осевая структура, представленная нуклеонемой, прикрепляющейся концами к ядерной оболочке, а нити ДНП, в свою очередь, прикрепляются к этой осевой структуре. Мы приводили в пользу предложенной гипотезы следующие аргументы. Утолщение нуклеонем после экстракции только 0,14 М NaCl объяснялось тем, что «хвосты» ДНК, оставшиеся связанными с нуклеонемами, преципитировали



вместе с гистонами на нуклеонемах в 0,14 М NaCl; 2 М NaCl удалял гистоны, и сохранившаяся ДНК уже не осаждалась на нуклеонемах. При нашей обработке препаратов ДНК не была видна в электронном микроскопе. Если мы не обрабатывали ядра ДНКазой, но экстрагировали раствором NaCl промежуточной концентрации (экстракция гистонов!), то ядра набухали, ДНК в них сохранялась, но была практически невидимой на срезах. Зато прекрасно проявлялись нуклеонемы. Очевидно, что эти аргументы не являлись решающими, но тем не менее в основных чертах предложенная модель соответствует сегодняшним представлениям. Через несколько лет после нашей публикации аналогичные данные получил Х. Буш в США.

Затем Г. Блобел (США) обнаружил, что непосредственно под ядерной мембраной располагается белковый слой, состоящий в основном из трех родственных белков с молекулярной массой около 70 кДа. Этот белковый слой был назван ламиной, а составляющие его три главные белка — ламинами. Наконец, Р. Березней и Д. Коффи (США) провели детальное исследование белкового состава ядер с помощью электрофореза в полиакриламидном геле. Они одновременно несколько усовершенствовали процедуру фракционирования. Ими же была введена и новая терминология. Материал ядра, остающийся после удаления ДНП, назван ядерным матриксом. В свою очередь, ядерный

Рис. 17. Электронно-микроскопическое исследование изолированных клеточных ядер, подвергнутых различным обработкам

а — участок изолированного клеточного ядра, фиксированного OsO_4 в растворе с низкой ионной силой; б — ядра экстрагировали 0,4 М NaCl и фиксировали OsO_4 в 0,4 М NaCl. Хроматин, лишенный гистона H1, деконденсирован и практически не виден. При этом хорошо проявляются нуклеонемы, в — ядра обрабатывали ДНКазой I и затем 2 М NaCl. Фиксация OsO_4 в 2 М NaCl. В ядре, кроме ядерной оболочки и ядрышек, видны тонкие 100 Å-фибриллы с 200 Å-гранулами, нуклеонемы; г — ядра обрабатывали ДНКазой I и затем 0,14 М NaCl. Фиксация OsO_4 в 0,14 М NaCl. Нуклеонемы выглядят как более толстые нити, видимо, в связи с налипанием на них ДНП; д — гипотетическая модель ядра. Обозначения: N — ядрышко, M — ядерная мембрана, P — поры ядерной мембраны, D — фибриллы хроматина, np — нуклеонемы (по результатам, полученным автором и Ю. С. Ченцовым)

матрикс разделен на **ламину** и **внутренний ядерный матрикс**, соответствующий нуклеонемам.

В последнее время мы часто используем в качестве функционального, т. е. для обозначения белкового остова хромосомы (хроматина), термин «**ядерный скелет**», понимая термин «**ядерный матрикс**» в операциональном смысле, т. е. как материал, остающийся после удаления из ядра ДНП, включая сюда не только белки, но ДНК и РНК.

Следующий важный шаг для понимания организации ядра сделали П. Кук и И. Бразел (Великобритания), которые показали, что если удалить из ядер все гистоны концентрированным соевым раствором или даже дегергентами, то ДНК не уходит из ядер, но остается в составе ядерного матрикса, образуя суперспирализованные петли. Был сделан вывод, что ДНК прикреплена в определенных точках к скелетным структурам ядра (см. выше). Аналогичные данные получены рядом других авторов.

Далее У. Лэмбли (Швейцария), обработав метафазные хромосомы ионным детергентом, либо 2 М NaCl, показал с помощью электронной микроскопии, что вся ДНК хромосомы входит в состав петель длиной 30—90 т. п. н., прикрепляющихся к белковой осевой структуре хромосомы, расположенной в центре последней («хромосомному остову») (рис. 18). После этих работ ядерный матрикс стал одной из популярных областей исследования, и появилось множество сообщений, как доказывающих, так и опровергающих его реальность. Противники ядерного матрикса аргументировали свои взгляды большой лабильностью последнего и изменчивостью его картины в электронном микроскопе. Крайняя точка зрения состоит в том, что внутренний ядерный матрикс, нуклеонемы, и остов метафазных хромосом являются результатом агрегации белков и РНК, происходящей во время экстракции 2 М NaCl. Однако в пользу «прижизненности» остова хромосом был получен целый ряд довольно убедительных данных. В частности, при окраске скелетных элементов метафазных хромосом серебром они выглядят одинаково как в исходных хромосо-

мах, так и после их экстракции 2 М NaCl (или ДНКазой + 2 М NaCl). Флюоресцирующие антитела к белкам остова также выявляют последний в нативных, не экстрагированных хромосомах.

За последние годы появилось также много работ по электронно-микроскопическому изучению тотальных препаратов метафазных хромосом. Полученные картины хорошо согласуются с представлением, согласно которому 300 Å-фибриллы ДНП отходят от неких центральных осевых структур, образуя петли (см. рис. 18). При набухании хромосом некоторые из этих петель разворачиваются, превращаясь в фибриллы типа бусин на нити.

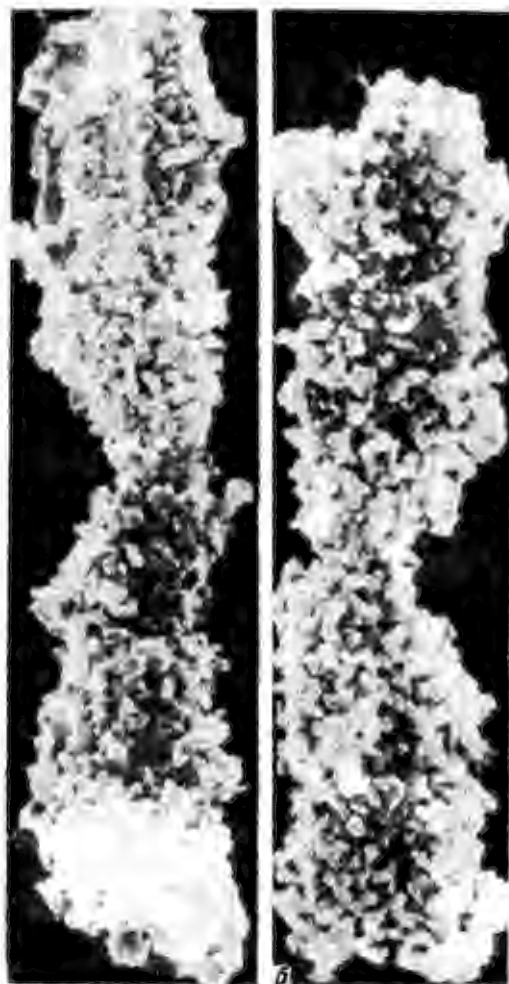
Сложнее обстоит дело с интерфазными ядрами, в которых окраска и серебром и антителами к белкам остова дает диффузное распределение по всему ядру. Последнее вполне естественно, если учесть деконденсацию хромосом в ядре, а также малый диаметр нуклеонем. Для выяснения «прижизненности» ядерного скелета и вынесения его функциональной роли было крайне важно установить природу белков и ДНК, входящих в его состав, и выяснить, являются ли места прикрепления ДНК к ядерному остову случайными или нет.

Специфичность ДНК в местах прикрепления к скелету^{1*} [125—129]. Все опыты ставятся по очень простой схеме. Клеточные ядра обрабатывают нуклеазами либо специфическими (рестриктазами), либо неспецифическими (микрококковая нуклеаза, ДНКаза I, ДНКаза II), после чего удаляют гистоны и отщепившуюся ДНК тем или иным способом (2 М NaCl, детергент, экстракция при низкой ионной силе). Иногда нуклеазная обработка повторяется после этого еще раз. В других случаях удаление гистонов 2 М NaCl или детергентом проводится перед нуклеазной обработкой. Если ядра выделены в условиях, исключающих нуклеазный гидролиз, то экстракция 2 М NaCl или детергентами удаляет только гистоны (дегистонизация), тогда как вся ДНК остается связанной с ядерным остатком.



Рис. 18. Петельная организация метафазных хромосом

а — петли ДНК в метафазных хромосомах после удаления из них гистонов. Внутри хромосомы четко виден белковый остов, к которому прикреплены петли ДНК, *б* — целые метафазные хромосомы в электронном микроскопе. Видно, что они состоят из 300 А-фибрилл, в свою очередь образующих структуры типа петель (по результатам, полученным У. Лэммли и Х. Бушем)



Первые опыты по характеристике ДНК, остающейся в ядерном матриксе после переваривания рестриктазами (EcoRI и HindIII) или микрококковой нуклеазой, были проведены в нашей лаборатории С. В. Разиным и В. Л. Мантьевой. В этих опытах ядерный матрикс выделяли из L-клеток мыши путем экстракции 2 М NaCl.

По мере углубления гидролиза (это особенно четко проявляется в опытах с микрококковой нуклеазой) падает размер и уменьшается количество ДНК, удерживаемой в ядерном матриксе. Простые расчеты позволили определить, что средний размер петли ДНК, выявляемый в таких опытах, т. е. среднее расстояние между двумя соседними точками прикрепления, составляет от 60 до 70 т. п. н.

Когда размеры оставшейся прикрепленной ДНК составили около 500—1000 п. н., с этой ДНК, которую мы далее обозначаем ямДНК (ДНК ядерного матрикса), были проведены ренатурационные опыты. Ее метили и ренатурировали в присутствии избытка тотальной ДНК клетки. В опытах такого рода выясняется, с какой фракцией ДНК коренатурирует меченая ДНК, которую берут в очень малых количествах. Оказалось, что ямДНК, полученная как из интерфазных ядер, так и из метафазных хромосом, обогащена повторяющимися нуклеотидными последовательностями и представляет собою неслучайную субфракцию от тотальной ядерной ДНК.

После этого появился ряд работ других авторов, часть которых подтверждали, а другие опровергали наши выводы. Дальнейшие эксперименты позволили объяснить эти противоречия. Результаты зависят от метода выделения. Если сразу проводить удаление гистонов и отщепившейся ДНК 1—2 М NaCl или малыми концентрациями детергента (например, дийодосалицилата лития, введенного в практику Лэммли), то ямДНК представляет неслучайную фракцию. Однако если перед этим инкубировать ядра в растворах с очень низкой ионной силой (например, 1 мМ ЭДТА), то происходит полное усреднение и ямДНК становится

неотличимой от тотальной ДНК. Нам кажется наиболее вероятным, что при предынкубации в растворах с низкой ионной силой происходит разрушение нативных контактов ДНК с матриксом, и этим объясняется случайный характер получаемого распределения ДНК. В пользу этой интерпретации говорят недавние опыты П. Кука и соавт. (Великобритания), которые разработали новый метод изоляции ядерного матрикса. Клетки заключали в агарозный гель, так что каждая оказывалась в своей отдельной камере. Их лизировали, промывали и в результате получали ядра, опять-таки сидящие в отдельных ячейках геля. Это препятствовало их агрегации при дальнейшей обработке. Затем ДНК подвергали нуклеазному гидролизу и удаляли отщепившуюся ДНК с помощью электрофореза при физиологических концентрациях солей. ДНК, остающаяся прикрепленной к остову, оказалась неслучайной фракцией ДНК: она была сильно обогащена транскрибируемыми последовательностями (см. разд. 3.4).

Наконец, за последние годы были выполнены работы, в которых авторы изучали места прикрепления ДНК к ядерному скелету в определенных индивидуальных областях генома. Были получены четкие данные, свидетельствующие в пользу специфичности мест прикрепления ДНК, причем в ряде случаев эти места прикрепления не зависели от процесса транскрипции (как в опытах Кука).

Первые такие данные были получены независимо У. Лэммли (Швейцария) и в совместной работе С. В. Разина (наша лаборатория) с К. Шеррером (Франция). В первой изучались места прикрепления гистоновых генов к ядерному скелету в культуре клеток дрозофилы, во второй — места прикрепления в районе α -глобиновых генов в эритроблестах и эритроцитах кур. В обеих работах были обнаружены специфические места взаимодействия. Мы вернемся к этим исследованиям ниже.

Возникает вопрос, имеют ли места прикрепления ДНК к скелету функциональное значение?

Прикрепления сателлитной ДНК к ядерному скелету^{1*} [130, 131]. В опытах С. В. Разина и О. В. Яровой измеряли размеры ДНК, остающейся с ядерным матриксом при предельном переваривании ДНК микрококковой нуклеазой. При электрофорезе выделенной ДНК было обнаружено два дискретных компонента, резко различающихся по своей молекулярной массе: один с размерами ~ 150 п. н., а другой с размерами ~ 10 т. п. н. (рис. 19).

Фрагменты длиной ~ 10 т. п. н. оказались весьма устойчивыми к различным обработкам. Во-первых, они были защищены от нуклеазы и в том случае, если последнюю добавляли после удаления гистонов 2 М NaCl. Во-

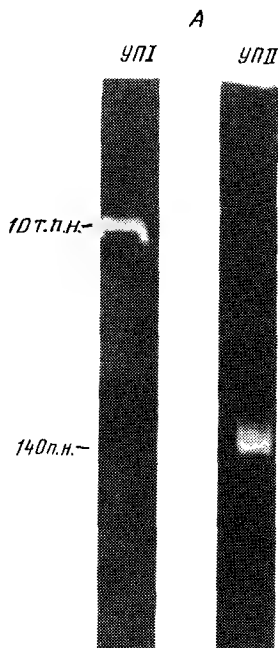
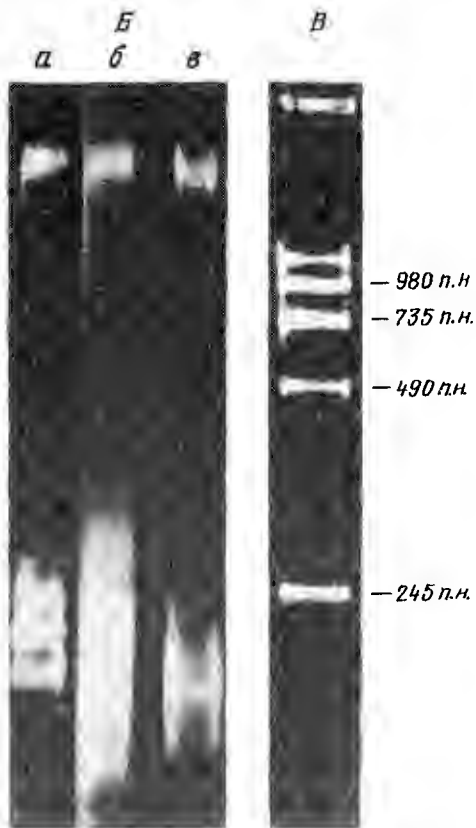


Рис. 19. Два типа прикрепления ДНК к ядерному скелету, различающиеся по размеру защищенной белками ДНК

А — выявление двух типов защищенных от нуклеаз фрагментов в составе ядерного матрикса клеток асцитного рака Эрлиха мышей. Электрофорез ДНК в агарозном геле вели в условиях, когда выявлялся лишь один из типов ДНК, а другой или удалялся из геля, или оставался на старте. Видно, что в обоих случаях защищенные от микрококковой нуклеазы фрагменты гомогенны по размеру. УП I и УП II участки прикрепления I и II типа.

Б — существование двух типов прикреплений в ядерном матриксе из разных источников: *а* — печень крысы, ядра обрабатывали микрококковой нуклеазой; *б* — культура клеток дрозофилы (линия КС). *в* — эритроциты кур, в случаях *б*, *в* ядра обрабатывали ДНКазой I. Электрофорез в 1,4%-ном агарозном геле позволяет одновременно видеть оба типа защищенной ДНК;

В — тяжелый компонент ям ДНК мыши представлен сателлитной ДНК, богатой А—Т-парами. Электрофорез ДНК тяжелого компонента вели после обработки эндонуклеазой EcoRII. Видно, что вся ДНК переходит в серию полос с размерами, кратными 245 п. н. (субъединица сателлитной ДНК);



Г—Д — полная защищенность тяжелого компонента от микрококковой нуклеазы. Электрофорез ям ДНК вели в 0,7%-ном нейтральном (Г) или щелочном (Д) агарозном геле. Препараты выделены после обработки возрастающими дозами нуклеазы. Ядерный матрикс содержал 1,75 % (а), 0,73 (б), 0,29 (в), 0,11 (г), 0,04 (д) и 0,02 % (е) от всей ДНК. Стрелки указывают позиции маркеров (10,8 и 5,4 т. п. н.). Таким образом, тяжелый компонент имеет размер 10 т. п. н. и не содержит даже одноцепочечных разрывов (по результатам, полученным С. В. Разиным и соавт.)

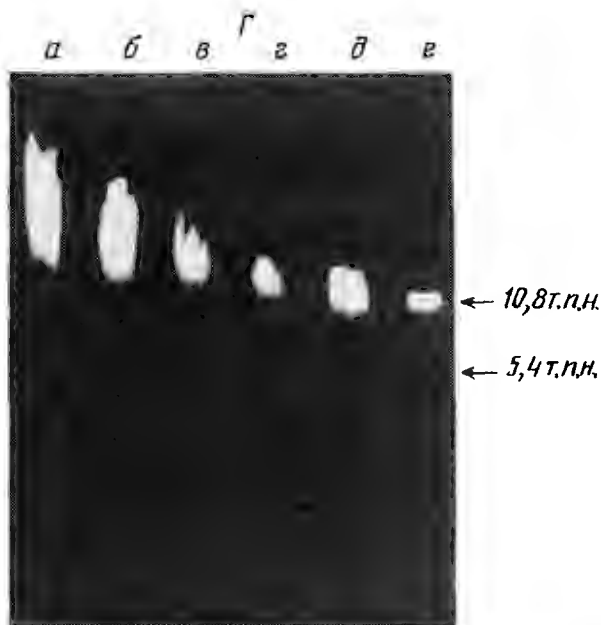


Рис. 19 (продолжение)

вторых, их присутствие не зависело от условий выделения ядерного матрикса. Так, предынкубация ядер в 1 мМ ЭДТА, резко снижавшая содержание коротких фрагментов, не сказывалась на фракции длинных фрагментов.

При равновесном ультрацентрифугировании в CsCl очищенная ямДНК с размерами около 10 т. п. н. взвешивалась в зоне с плотностью 1,69 г/см³, что соответствует плотности сателлитной ДНК мыши. При переваривании рестриктазой EcoRI был получен набор дискретных фрагментов с размерами, кратными 245 п. н., что также характерно для сателлитной ДНК, состоящей из коротких повторяющихся последовательностей. Таким образом, длинные защищенные

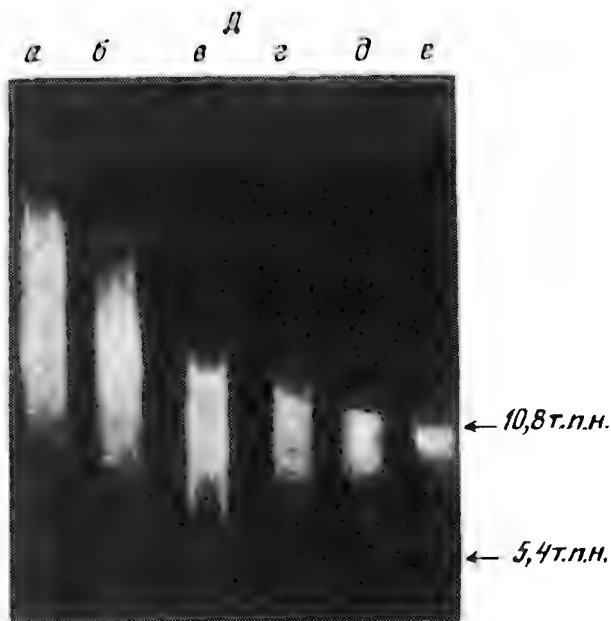


Рис. 19 (окончание)

фрагменты состоят из сателлитной ДНК, хотя только небольшая ее доля входит в состав защищенной от нуклеаз фракции ($\sim 0,2\%$). Расчеты показывают, что число таких фрагментов на ядро составляет ~ 100 , т. е. около двух на хромосому. Ряд косвенных данных позволяет предположить, что эти места прикрепления располагаются на ядерной ламине. Известно, что сателлитная ДНК локализуется в области центромеров и теломеров хромосом. Учитывая все это, можно с большой вероятностью предположить, что длинные защищенные от нуклеаз участки сателлитной ДНК представляют собою места стабильного прикрепления хромосом к ядерной ламине и тем самым к ядерной оболочке в области центромеров и/или теломеров.

Прикрепление к ядерному скелету транскрибируемой ДНК^{1*} [127, 132—136]. Рядом авторов было найдено, что ДНК, остающаяся прикрепленной к ядерному скелету после переваривания рестриктазами или нуклеазами, обогащена транскрибирующимися последовательностями. Ядерный матрикс из эритроидных клеток обогащен глобиновыми генами, а ядерный матрикс из клеток яйцеводов — овальбуминовыми генами, но не наоборот.

Поскольку, однако, вскоре появились и прямо противоположные данные, то С. В. Разин и О. В. Яровая решили разобраться в этом вопросе более глубоко. Они нашли, что при стандартном выделении ядерного матрикса из клеток миеломы мышей, активно продуцирующей иммуноглобулин, ямДНК, остающаяся связанной со скелетными структурами после отщепления 90—95 % всей ядерной ДНК, содержит во много раз больше последовательностей, гибридизирующихся с клонированными генами тяжелых цепей иммуноглобулинов, чем отщепившаяся или тотальная ДНК (рис. 20). В то же время у фибробластов мышей, в которых иммуноглобулины не синтезируются, никакого обогащения ядерного матрикса иммуноглобулиновыми генами найдено не было. Таким образом, данные о связывании транскрибирующейся ДНК с ядерным матриксом были подтверждены. Далее оказалось, что если перед выделением ядерного матрикса ядра инкубировали в растворах с низкой ионной силой, распределение иммуноглобулиновых генов между отщепленной и связанной ДНК было равномерным. Это объясняло имевшиеся в литературе противоречия. Все, следовательно, зависит от используемого метода выделения ядерного матрикса. Вероятно, предынкубация в 1 мМ ЭДТА каким-то образом разрушает ассоциацию транскрибирующейся ДНК с ядерным скелетом, т. е. именно она вызывает артефакт (а не прямая экстракция 2 М NaCl). На это указывает упомянутая выше работа Кука и сотр., которые выделяли ядерный матрикс из ядер, заключенных в агарозный гель, пользуясь только растворами с физиоло-

гической концентрацией солей. В этих опытах транскрибируемая ДНК опять-таки оказалась связанной с ядерным скелетом. что является сильным доказательством существования такой ассоциации *in vivo*.

Каким образом происходит ассоциация транскрибирующей ДНК с ядерным матриксом? Участвуют ли в этом РНК, РНК-полимераза или другие факторы? Были поставлены опыты двух типов. Во-первых, ядра обрабатывали на той или иной стадии выделения ядерного матрикса РНКазой, разрушая новообразованную РНК. Это, однако, никак не сказывалось на обогащении ядерного матрикса активными генами (в данном случае — иммуноглобулиновыми). Следовательно, взаимодействие с ядерным скелетом происходит не через новообразованную про-мРНК, хотя последняя, как это показано в большом числе работ, тоже связана с ядерным матриксом (см. гл. 5).

В другой серии опытов исследовалось распределение связанной с ДНК РНК-полимеразы II во фракции ДНК, оставшейся в ядерном матриксе после удаления той или иной части всей ДНК. Оказалось, что общая активность РНК-полимеразы ядерного матрикса оставалась неизменной при удалении от 10 до 98 % всей ДНК, и в результате ее удельная активность на единицу ДНК возрастала в 50 раз. Так было при получении ядерного матрикса экстракцией 2 М NaCl. Если же проводить предобработку ядер в растворе с очень низкой ионной силой, то общая активность РНК-полимеразы II в ядерном матриксе падала строго пропорционально снижению содержания ДНК (см. рис. 20).

Итак, очевидно, взаимодействие транскрибирующей ДНК с ядерным скелетом вовлекает каким-то образом сам транскрипционный комплекс, включая РНК-полимеразу II. Обработка растворами с очень низкой ионной силой разрушает это взаимодействие. Отсюда, однако, не следует, что сама РНК-полимераза II взаимодействует с ядерным скелетом.

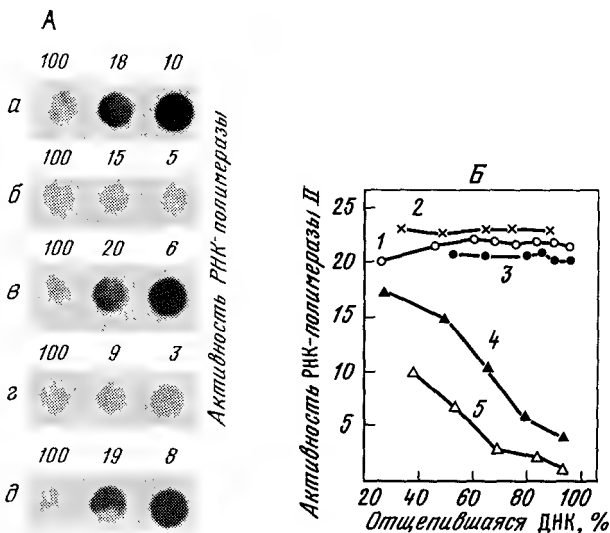


Рис. 20. Демонстрация связи транскрипционно активного хроматина с ядерным скелетом

А — гибридизация меченой последовательности иммуноглобулинового гена *С_μ* с различными препаратами ДНК из клеток мыши; *а* — ДНК ядерного матрикса (ямДНК) из клеток гибридомы мыши, синтезирующей иммуноглобулин IgM (кодируемый вышеуказанным геном); выделенные ядра обрабатывали микрококковой нуклеазой и экстрагировали в 2 М NaCl; *б* — ямДНК из клеток SVT2; выделение ядерного матрикса велось, как в *а*; *в* — ямДНК из гибридомы; ядра перед экстракцией 2 М NaCl обрабатывали ДНКазой I и РНКазой А; *г* — ямДНК из клеток гибридомы; ядра после нуклеазной обработки экстрагировали раствором с низкой ионной силой и затем 2М NaCl; *д* — ямРНК из клеток гибридомы, ядра обрабатывали микрококковой нуклеазой, затем 2 М NaCl и далее раствором с низкой ионной силой

Цифры указывают содержание ДНК, оставшейся в препарате ядерного матрикса в процентах от тотальной ДНК. Они зависят от глубины нуклеазной обработки в каждом отдельном случае. Первая цифра (100) получалась в отсутствие нуклеазной обработки. Видно, что ямДНК гибридомы обогащена *С_μ* генами в случае, если ядра после нуклеазного гидролиза обрабатывают 2 М NaCl, но не раствором с низкой ионной силой. В то же время предварительная обработка 2 М NaCl предупреждает диссоциацию транскрибирующейся ДНК. *Б* — связь РНК-полимеразы II с ямДНК. Приводится общая РНК-полимеразная активность в препарате ямДНК в зависимости от процента ДНК, отщепленной от ядерного матрикса

Прочно связанные белки клеточного ядра, ядерный матрикс и транскрипция^{1*} [137—139]. С. В. Разиным и соавт. в нашей лаборатории был сделан еще один шаг на пути понимания природы этого взаимодействия. Была установлена связь ядерного матрикса, транскрипционного комплекса и так называемых прочно связанных с ДНК белков.

Рядом авторов, начиная с работ Т. Андо и Т. Иде (Япония), было показано, что при выделении ДНК остаются прочно связанными с ней некоторые полипептиды, в основном с молекулярной массой $\sim 50\text{—}60$ кДа. Мы предположили, что эти белки могут играть роль в прикреплении ДНК к ядерному матриксу, и исследовали распределение прочно связанных белков между связанной с матриксом и отщепленной ДНК. Опыты велись на фибробластах мыши (L-клетках).

После разделения ям ДНК (подбирали такие условия нуклеазного гидролиза, чтобы размеры ее составляли 3—5 т. п. н.) и отщепившейся ДНК их отделяли от свободных белков ультрацентрифугированием в сульфате цезия в присутствии детергента саркозила. Далее проводили химическое мечение белков, оставшихся в препарате ДНК, с помощью радиоактивного [¹²⁵I]. ДНК полностью разрушали нуклеазами, а белки разделяли электрофорезом и выявляли автордиографически благодаря метке. Таким способом в препаратах ДНК было выявлено 7 белковых компонентов с молекулярными массами 60, 50, 43, 37, 31, 27 и 18 кДа, обозначенных как р60, р50 и т. д. Оказалось, что все они, кроме р18, присутствуют исключительно в составе ДНК ядерного матрикса, и только р18 распределен равномерно в обеих фракциях ДНК (рис. 21).

1 — ядра обрабатывали микрококковой нуклеазой и далее 2 М NaCl, 2 — обработка ДНКазой I и 2 М NaCl, 3 — обработка ДНКазой I + РНКазой А и 2 М NaCl; 4 — обработка микрококковой нуклеазой и раствором с низкой ионной силой; 5 — обработка микрококковой нуклеазой, раствором с низкой ионной силой и 2 М NaCl.

Синтез РНК вели в растворе, содержащем 0,25 М сульфата аммония, что позволяет выявлять эндогенную РНК полимеразу II. Активность РНК-полимеразы II выражали в пикомолях на 10^6 ядер (по результатам, полученным С. В. Разиным и соавт.)

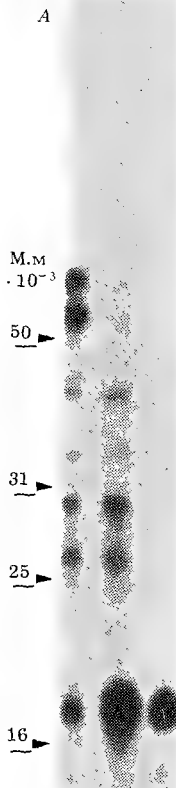
Рис. 21. Прочно связанные с ДНК белки (ПСД-белки) и их ассоциация с транскрипционно активной ДНК

А — электрофореграмма ПСД белков. Из L-клеток мыши получали ямДНК и отщепившуюся ДНК, очищали их от белков ультрацентрифугированием в градиенте плотности Cs_2SO_4 в присутствии саркозила и метили белки радиоактивным йодом. После этого ДНК разрушали ДНКазой, разделяли белки электрофорезом в полиакриламидном геле в додецилсульфате натрия. На рисунке приведены автордиографы электрофореграмм, а — ПСД-белки из ямДНК; б — то же, но после обработки β -меркаптоэтанолом (SH реагент), который удаляет основную часть двух тяжелых белков, в — ПСД белки в отщепленной ДНК; Б — дот-гибридизация между меченой [^{32}P] α -глобиновой ДНК курицы с ДНК, связанной и не связанной с ПСД-белками. Видно, что во всех клетках эритроидного ряда (но не фибробластах) ПСД-белки ассоциированы с транскрибируемой ДНК (по результатам, полученным С. В. Разным и соавт.)

Если заменить при ультрацентрифугировании в сульфате цезия саркозил на более мягкий диссоциирующий агент — гуанидинхлорид, то в ямДНК открывается существенно больше белков. Опять-таки все эти белки не видны во фракции отщепившейся ДНК.

Одни и те же прочно связанные белки (ПСБ) были выявлены нами в препаратах ямДНК из интерфазных ядер и из метафазных хромосом, т. е. они не утрачивались в течение всего клеточного цикла.

Мы предположили, что ПСБ участвуют в прикреплении петель ДНК к ядерному скелету. Однако поскольку, как мы



		ДНК, связанная с ПСД-белками	Свободная ДНК	Тотальная ДНК	Количество ДНК в пятне, мкг
Ядра фибробластов					3,2
					0,8
					0,2
Ядра эритроцитов					3,2
					0,8
					0,2
Ядра эритробластов	обычное выделе- ние				3,2
					0,8
					0,2
	предобра- ботка 1 мМ ЭДТА				3,2
					0,8
					0,2

уже отчасти видели, имеется несколько разных типов при-
крепления (см. также последующие разделы), важно было
выяснить, к какому из них имеют отношение ПСБ. Для
этого в ряде лабораторий, и в том числе в нашей, С. В. Ра-
зиным и соавт. было проведено выделение ДНК, входя-

щей в комплекс с ПСБ, и изучены ее гибридизационные свойства. В этих экспериментах использовали препараты фрагментированной тотальной ДНК, очищенные центрифугированием в градиенте плотности сульфата цезия в присутствии саркозила. Фрагменты ДНК, содержащие ПСБ, отделяли от свободной ДНК путем связывания с нитроцеллюлозными фильтрами, на которых белки задерживаются. Задержанную на фильтрах фракцию ДНК элюировали с фильтров и характеризовали с помощью гибридизационных экспериментов.

Оказалось, что связанные с белками фрагменты тотальной ДНК эритробластов обогащены глобиновыми генами, активно транскрибирующимися в этих клетках, в той же мере как и ямДНК эритробластов (см. рис. 21). Следовательно, ПСБ преимущественно присутствуют в составе транскрипционно активного хроматина. Ассоциация глобиновых генов с ПСБ сохраняется и в эритроцитах кур, хотя там синтез глобиновой РНК уже прекращен. В то же время в фибробластах цыпленка комплексы ДНК—ПСБ обеднены глобиновыми генами. Итак, ПСБ ассоциированы как с транскрибируемыми, так и с потенциально транскрибируемыми генами. Однако только в эритробластах кур, но не в эритроцитах, комплексы ДНК—ПСБ находились в составе ямДНК. Следовательно, прекращение транскрипции ДНК ведет к утрате связи между ядерным матриксом и комплексами ДНК—ПСБ. Приведенные данные указывают на участие ПСБ в процессах транскрипции и, возможно, в связывании с ядерным скелетом транскрибирующейся ДНК. В настоящее время исследуется природа ПСБ.

Контакты концов единиц транскрипции с ядерным скелетом через топоизомеразу II [128, 140—142]. В 1984 г. У. Лэмбли (Швейцария) разработал новый метод выделения ядерного матрикса, исключив использование концентрированных солевых растворов. Вместо этого гистоны и отщепленную ДНК удаляли в растворах с низкой ионной силой детергентом дийодсалицилатом лития (ЛИС). Ис-

следовали места прикрепления к ядерному остову гистоновых генов на культуре клеток дрозофилы, где эти гены довольно активно транскрибируются. ДНК после удаления из ядер гистонов с помощью экстракции ЛИС переваривали рестриктазами и затем определяли наличие или отсутствие определенных рестриктных фрагментов в связанной и отщепившейся ДНК путем гибридизации меченых гистоновых концов с блотами по Саузерну. Гистоновые гены, как известно, представлены повторяющимися кластерами, каждый из которых состоит из пяти генов для пяти разных гистонов. Все гистоновые гены разделены спейсерами. Оказалось, что при выделении ядерного матрикса с помощью ЛИС лишь одна область из гистонического кластера выявляется в составе ядерного матрикса, а остальные участки переходят в раствор. Зона связывания кластера с ядерным остовом лежит между генами для гистонов H1 и H3, и она обогащена АТ-парами (рис. 22).

Путем обработки ядерного матрикса разными рестриктазами и экзонуклеазой удалось уточнить структуру зоны связывания. Она состоит из двух участков, защищенных белками от экзонуклеаз, по 200 п. н. каждый, а между ними расположен участок, атакуемый после дегистонизации рестриктазой и экзонуклеазами, длиной около 100 п. н. Области связывания с белками ядерного матрикса содержат много последовательностей, которые узнаются ферментом топоизомеразой II.

Вслед затем Лэмбли и соавт. исследовали таким же методом ряд других генов дрозофилы, в том числе гены теплового шока, алкогольдегидрогеназы, участок генома, включающий область длиной в 320 т. п. н., и др. Оказалось, что для активных или потенциально активных генов точки прикрепления к ядерному матриксу располагаются лишь перед 5'-концом и за 3'-концом гена. Они как бы обрамляют ген. Их локализация более или менее близка к локализации энхансера, хотя утверждение о совпадении энхансеров и мест прикрепления пока нельзя считать доказанным. Там,

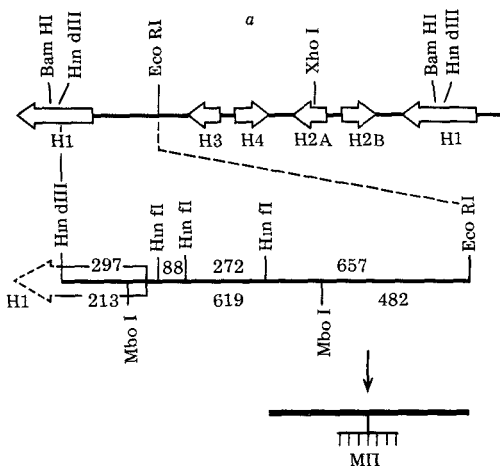
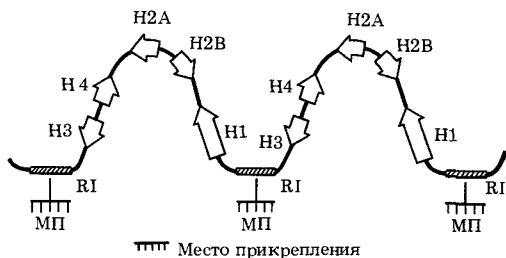


Рис 22 Специфическое место прикрепления к хромосомному остову в повторе гистоновых генов *D melanogaster* на препаратах ядерного матрикса, полученного с помощью детергента ЛИС

a – рестриктивная карта повторяющейся единицы содержащей гистоновые гены. На ней указаны 657 п. н. Hm dIII/EcoRI фрагмент остающийся связанным с остовом после обработки дегистонизированных ядер рестриктазами. *б* – схема иллюстрирующая петли содержащие гистоновые гены дрозофилы. МП – место прикрепления (по результатам полученным У Лэммли и соавт.)

где гены не активны или мало активны, это правило не выдерживается, и в таких областях генома места прикрепления вообще встречаются реже (одно на 20–100 т. п. н.). Итак, фракционирование детергентом разрушает лишь часть связей транскрипционного комплекса с ядерным скелетом, но сохраняет другие типы контактов, в частности контакты ядерного скелета с местами, окружающими с двух сторон активные гены.

Какова природа белков, ответственных за прикрепление в этих точках? Рядом авторов было показано, что ядерный матрикс содержит большие количества фермента топо-



изомеразы II. Последняя составляет один из основных белков ядерного матрикса. В хорошо очищенном остове метафазных хромосом топоизомераза II — это один из двух главных белковых компонентов. Некоторые данные позволяют предположить, что в прикреплениях ДНК к ядерному скелету, выявляемых методом с использованием ЛИС, основную роль как раз и играет топоизомераза II. В тех случаях, когда известны нуклеотидные последовательности ДНК в местах прикрепления, там всегда обнаруживаются сигнальные последовательности, узнаваемые этим ферментом. Более того, связывание антител к топоизомеразе II с препаратами ядерного матрикса ведет к увеличению размеров области, защищенной от действия экзонуклеазы. Это является уже довольно прямым подтверждением предположения о роли топоизомеразы II в связывании ДНК с ядерным остовом.

В приведенных опытах нельзя было исключить, однако, возможность артефактного связывания ДНК. Дело в том, что если просто добавить меченые рестриктивные фрагменты к препаратам ядерного матрикса, выделенным с помощью ЛИС, то происходит избирательное связывание тех же самых фрагментов, которые выявляются и в самом ядерном матриксе. Поэтому сейчас трудно сказать, что же на самом деле происходит в клеточном ядре *in vivo*.

Ассоциация репликативных вилок с ядерным матриксом [143, 144]. Р. Берзней и Д. Коффи (США) впервые обнаружили, что ДНК, метившаяся после пульсовой метки [^3H]-тимидином, в основном выявляется во фракции ядерного матрикса. В последующем эти результаты получили подтверждение в работах многих других авторов. Меченная в ходе короткого импульса ДНК остается связанной с ядерным скелетом и в том случае, если для выделения ядерного матрикса использовали метод электроэлюции в растворе с физиологической концентрацией солей. Следовательно, данный тип ассоциации ДНК с ядерным остовом не является артефактом, вызванным, скажем, экстракцией раствором с высокой ионной силой. Очевидно, репликативная машина образует комплекс с ядерным скелетом и, таким образом, все участки ДНК при репликации временно ассоциируются с ядерным скелетом. Общий вклад репликативных вилок в ДНК ядерного матрикса, однако, очень невелик, составляя, как показывают простые расчеты, не более 1 % всех взаимодействий ДНК с ядерным скелетом. Детали этого взаимодействия изучены мало, хотя есть данные, согласно которым с ядерным матриксом связан ряд ферментов, участвующих в репликации, а именно ДНК-полимераза α и ДНК-праймаза.

Начала репликации — места устойчивого взаимодействия ДНК со скелетными структурами ядра ^{1*} [145 – 147]. В настоящее время с помощью двух подходов установлено, что одним из мест прикрепления ДНК к ядерному скелету являются начала репликации ДНК, причем эти прикрепления не являются временными. Они сохраняются и в условиях полного отсутствия репликации, т. е. они не связаны непосредственно с функционированием ядра.

Первый подход предложен Ф. Ванкой и соавт. (Голландия). Он заключается в том, что клетки синхронизируют, блокируя вступление их в фазу S, т. е. фазу репликации, а затем одновременно разрешают репликацию и добавляют меченый предшественник. При этом после короткой

инкубации помеченными, очевидно, окажутся в основном начала репликации. Оказалось, что меченная таким образом ДНК остается предпочтительно связанной с ядерным скелетом на всех последующих стадиях клеточного цикла. В то же время импульсная метка, включенная в ДНК в середине S-фазы, быстро перемещается в удаленные от ядерного скелета части петель ДНК.

Другой подход разработан в нашей лаборатории С. В. Разиным и Е. М. Луканидиным. Он заключается в физическом выделении фрагментов ДНК, включающих начала репликации, и фрагментов ДНК, содержащих места прикрепления к ядерному скелету, и сравнении их между собою.

Фрагменты ДНК, содержащие начала репликации, выделяли по модифицированному методу Р. Мартина (США) (рис. 23). Клетки метили в течение длительного времени [^{14}C]-тимидином и затем (после удаления меченных нуклеотидов из среды) в течение нескольких минут [^3H]-дезокситидином и бромдезоксисуридином (БДУ). Таким образом, тотальная ДНК была мечена [^{14}C], а новообразованная — [^3H] и, кроме того, новообразованная ДНК была более тяжелой за счет включения БДУ. Как видно из рис. 23, новообразованная ДНК может присутствовать на концах длинных растущих цепей ДНК, полностью занимать только что начатые новые цепи ДНК и, наконец, находиться в области репарации ДНК. Только что начатые цепи ДНК, очевидно, содержат в своем составе начала репликации.

Следующий этап работы — выделение ДНК и «выплавление» новообразованных цепей путем инкубации ДНК при температуре, близкой к денатурирующей. При этом новообразованная ДНК размером от 100—200 п. н. до 4 5 т. п. н. выплавляется из длинных цепей ДНК за счет «миграции ветвей» и образует более короткие двухцепочечные молекулы. При ультрацентрифугировании в сахарозном градиенте эти цепи можно отделить от основной

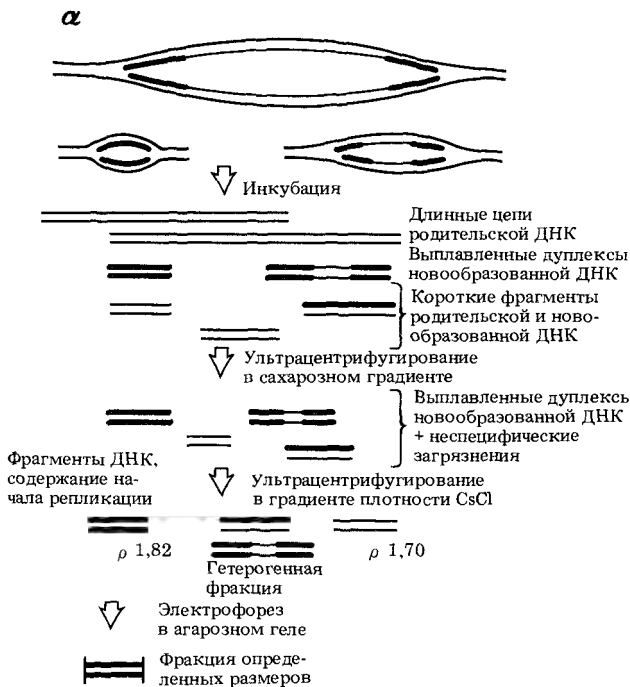


Рис. 23. Стабильные прикрепления ДНК к ядерному скелету в областях, содержащих начала репликации ДНК

а — схема выделения начал репликации из культуры клеток эритробластов кур, меченных в течение нескольких минут $[^3\text{H}]$ -дезокситидином и бромдезоксидином, тяжелые цепи новообразованной ДНК обозначены жирными линиями;

б — распределение импульсно меченой $[^3\text{H}]$ и меченой в течение 48 ч $[^4\text{C}]$ ДНК после первого (*А*) и последнего (*Б*) ультрацентрифугирования в градиенте плотности CsCl. На седиментограмме (*Б*) выявляется лишь импульсно меченная тяжелая ДНК, 1 — $[^3\text{H}]$; 2 — $[^4\text{C}]$, 3 — плотность CsCl.

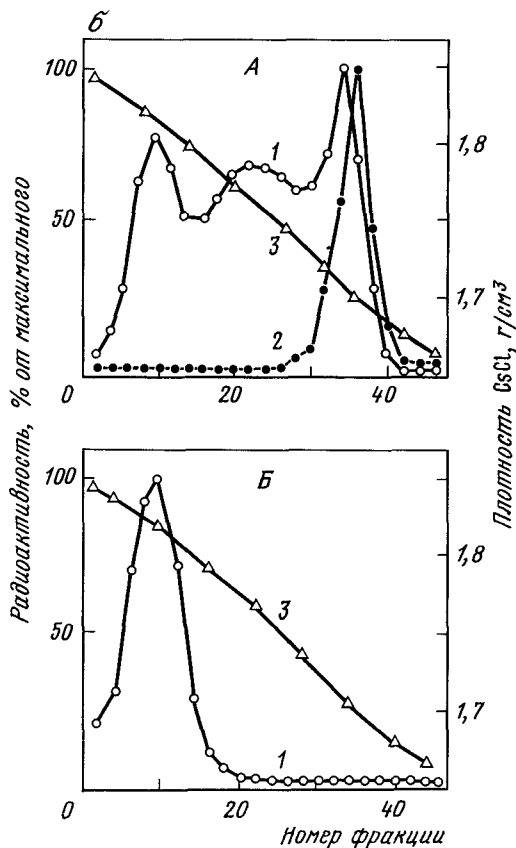


Рис. 23 (продолжение)

в доказательства специфичности мест прикреплений ДНК к ядерному скелету. Фрагменты ямДНК эритробластов (1) или эритроцитов (3) или тотальной ДНК (2) размером ~ 5 т п н метили и ренатурировали в присутствии избытка ямДНК эритроцитов (того же размера). Перед проведением ренатурации ДНК дробили на 200 н-фрагменты. Анализ ренатурации вели с помощью хроматографии на гидроксипатите. Велся учет только ренатурации уникальных последовательностей ДНК (интервал C_0t от 10^{-10} до 10^{-4}). Видно, что ямДНК эритроцитов это

массы ДНК, меченной [^{14}C], поскольку размеры последней значительно больше. Однако легкая фракция, кроме фрагментов ДНК с началами репликации, будет содержать обломки меченой [^3H] ДНК, фрагменты Оказаки, происходящие из репликативных, вилок, продукты репарации ДНК и т. д.

Следующий этап очистки — ультрацентрифугирование в равновесном градиенте CsCl , ведущее к разделению ДНК по плотности. При этом удаляется большинство неспецифических фрагментов ДНК, ибо они имеют промежуточную плотность между обычной ДНК ($1,7 \text{ г/см}^3$) и ДНК, в которой тимидин замещен на БДУ ($1,80 \text{ г/см}^3$). Только небольшие фрагменты, включающие начала ре-

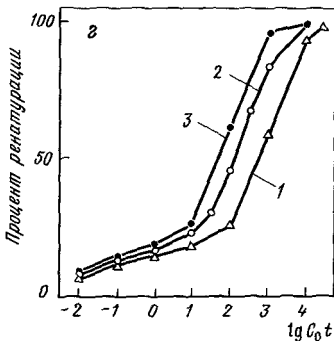
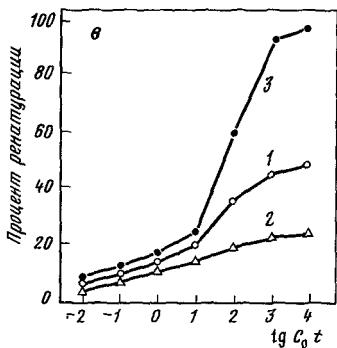


Рис. 23 (продолжение)

небольшая специфическая фракция тотальной ДНК, составляющая менее 10 % ее. Она также является подфракцией ямДНК эритробластов (около $1/4$ последней); γ — коренатурация меченой ДНК начал репликации с избытком тотальной ДНК (1), ямДНК эритробластов (2) и ямДНК эритроцитов (3). Во всех случаях ренатурация начал репликации идет на 100 %. Все уникальные последовательности, окружающие начала репликации, выявляются в составе ямДНК как эритробластов, так и эритроцитов;

δ — опыт по выяснению локализации начал репликации на α -глобиновом домене курицы; λ , α^D , α^A — глобиновые гены, A — рестриктивные фрагменты клонов, содержащих область α -глобиновых генов, I, II, III и IV — клоны и рестриктазы, приведенные на нижней схеме, B — гибридизация блотов с тотальной ДНК (выявление повторяющихся последовательностей), B — гибридизация с началами репликации

8

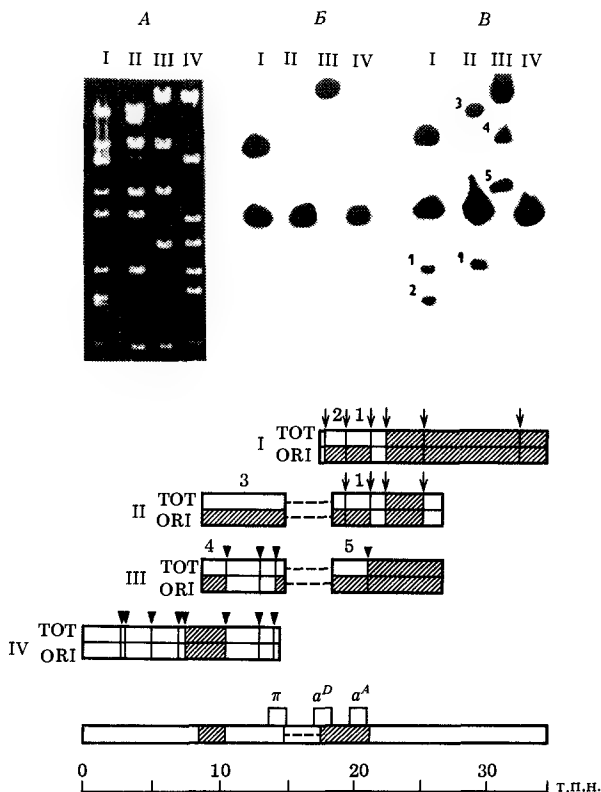


Рис. 23 (окончание)

(фрагменты ДНК размером ~ 2 т. п. н.) Цифрами отмечены фрагменты, гибриди-
зующиеся с ori-ДНК, но не с тотальной ДНК

Внизу приведены карты (I–IV) клонов и фрагменты, гибридирующие с тотальной
ДНК (тот) и ori-ДНК (ори), а также общая карта области с указанием мест
локализации ori-ДНК. С теми же участками гибридизуется и ямДНК из эритроци-
тов кур (по результатам, полученным С. В. Разным и соавт.).

пликации, полностью замещены БДУ. Наконец, чтобы удалить одноцепочечные ДНК и РНК (тоже имеющие высокую плотность), препараты обрабатываются РНКазой и нуклеазой S1. После этого для окончательной очистки проводится еще два ультрацентрифугирования в CsCl и, наконец, разделение фрагментов, содержащих начала репликации, на фракции определенных размеров путем электрофореза в агарозном геле с последующей элюцией из него.

Работа велась на клетках культуры эритробластов кур. Поскольку клетки не синхронизированы по циклу и одновременно иницируется лишь небольшое число репликонов (единиц репликации), то выход ДНК, содержащей начала репликации, крайне невелик. Приходится работать с несколькими литрами суспензии клеток. Однако отсутствие синхронизации позволяет получить в изолированном препарате фрагменты, содержащие **все начала репликации**, используемые в данном типе клеток. Тем не менее даже то небольшое количество ДНК, которое удается получить, можно использовать для клонирования и для изготовления высокомеченой гибридизационной пробы.

Выделение ям ДНК в наших опытах вели стандартным методом (с экстракцией 1—2 М NaCl) из двух типов клеток кур: эритробластов (культура клеток) и эритроцитов (у птиц они содержат ядра).

Дальнейший анализ полученных фракций ДНК велся двумя методами (см. рис. 23). Первый метод, коренатурация следовых количеств меченой ДНК с избытком немеченой ДНК, позволял сравнивать разные препараты ДНК в целом. Поскольку повторяющиеся последовательности могут встречаться в любых участках генома, то их исключали из анализа и сравнивали между собою только уникальные последовательности ДНК, ренатурирующие в интервале C_0t от 10^2 до 10^4 . Чтобы этих последовательностей было достаточно, работали с фракциями ДНК размером ~ 5 т. п. н. Если ренатурировать любую меченую ДНК с избытком немеченой тотальной ДНК, то происходит,

естественно, ее полная ренатурация, так как в тотальной ДНК представлены все последовательности генома. Если, наоборот, ренатурировать меченую тотальную ДНК с избытком немеченой ямДНК, то связываются лишь около 25 % тотальной ДНК в случае, если ямДНК получена из эритробластов, и менее 10 %, если она получена из эритроцитов. Следовательно, ямДНК представлена лишь фракцией всей ДНК, причем в активных эритроблестах эта фракция относительно велика (при размерах фрагментов около 5 т. п. н.), а в неактивных как в отношении репликации, так и в отношении транскрипции эритроцитах она существенно меньше. Этого можно было ожидать, ибо, как отмечалось выше, ассоциация транскрибируемой ДНК с ядерным матриксом в неактивных эритроцитах исчезает. Действительно, меченая ямДНК эритроцитов полностью коренатурировала с ямДНК эритробластов. В обратной постановке ренатурация меченой ДНК шла лишь на 25 %.

Центральным экспериментом было проведение ренатурации меченых фрагментов, содержащих начала репликации с избытком ямДНК. Оказалось, что в отличие от тотальной ДНК меченые фрагменты ДНК, содержащей начала репликации, **полностью** ренатурировали с ямДНК не только эритробластов, но и эритроцитов. Таким образом, даже при полном исключении репликации и почти полном исключении транскрипции начала репликации ДНК оставались связанными с ядерным скелетом. Иными словами, эти контакты являются одними из наиболее устойчивых.

Другой тип анализа заключался в исследовании гибридизации ~ 2 т. п. н. фрагментов ДНК, содержащей начала репликации, с рестриктными фрагментами домена α -глобиновых генов. Оказалось, что метку связывают те же две области, что и при гибридизации с ямДНК эритроцитов, т. е. на конкретной области генома получен тот же результат, что и при работе с тотальной ДНК.

Возникает вопрос, все ли места связывания ДНК с ядерным скелетом в неактивных клетках идут через начала

репликации. К сожалению, прямой опыт с использованием ренатурации в избытке ДНК, содержащей начала репликации, технически затруднен из-за невозможности получить достаточные количества материала. Однако был принят опыт другого типа. Из ям ДНК эритроцитов получены клоны, из них отобраны те, которые содержат только уникальные последовательности ДНК, и ДНК этих клонов прогибридизована с мечеными фрагментами, содержащими начала репликаций. Не менее половины всех клонов дали положительный ответ и, следовательно, не менее половины всех мест прикрепления ДНК к ядерному скелету, сохраняющихся в ядрах эритроцитов, идут через начала репликации. Пока не известны белки, через которые начала репликации связываются с ядерным скелетом. Очевидно только, что это не ПСБ, так как их комплексы с ДНК в эритроцитах отсоединяются от ядерного матрикса.

Простые расчеты показывают, что если фрагменты 5 т. п. н. м ДНК эритроцитов составляют менее 10 % от всей ДНК, то расстояния между точками прикрепления должны быть больше 50 т. п. н. Если половина из них соответствует началам репликации, то средняя дистанция между последними — больше 100 т. п. н., что не отличается сильно от известных из литературы величин. Прикрепление начал репликации к ядерному скелету функционально выгодно, так как оно позволяет начинать репликацию с легко находимого и фиксированного участка ДНК. Можно думать, что затем репликация идет с помощью продергивания всего репликона через репликативный аппарат, расположенный в том же месте ядерного скелета, где находится начало репликации. Наличие топоизомеразы II в ядерном скелете в этом случае весьма осмысленно, ибо известно, что она участвует в репликации и, в частности, осуществляет разделение двух сцепленных молекул ДНК, образующихся в ходе последней.

Степень компактности ДНК, достигаемая за счет образования петель. Средний размер ДНК, входящей в состав

петли у млекопитающих, составляет 50—100 т. п. н., или 1700—3400 нм. Это в 600—1000 раз превышает диаметр соленоида (30 нм). Если допустить плотную упаковку соленоидных петель на скелетной нити, то общий уровень компактизации ДНК составит примерно 10^3 (из них ~ 25 -кратная редукция линейных размеров придется на 3-й уровень укладки). Эта степень компактизации отражает, вероятно, ситуацию в интерфазном ядре. Однако в метафазной хромосоме достигается примерно еще десятикратное снижение линейных размеров.

Следует подчеркнуть, что в отличие от нуклеосомного и соленоидного, петельный уровень организации хроматина носит уже не чисто структурный, но и функциональный

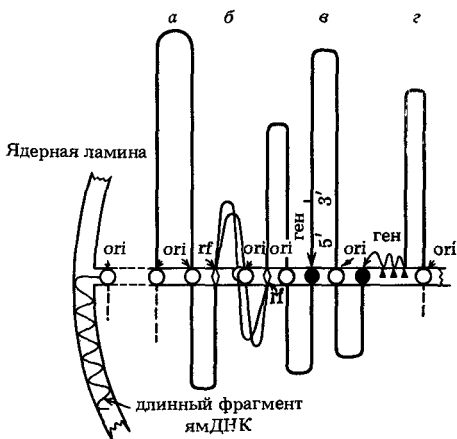


Рис. 24. Схема, иллюстрирующая разные типы прикрепления ДНК к ядерному матриксу

а — неактивная петля ДНК, прикрепленная через начала репликации (ori); б — реплицирующаяся петля с дополнительными контактами через репликационные вилки (rf), в — петля с потенциально активным геном, прикрепленным за 5'-область; г — петля, содержащая работающий ген с дополнительными контактами по всей длине гена Слева — прикрепление хромосомы к ядерной ламине через длинный фрагмент сателлитной ДНК

Таблица 3.
Зависимость природы выявляемых контактов
между ядерным скелетом и ДНК
от метода выделения ядерного матрикса

Метод выделения ядерного матрикса	10 т. п. н- контакты сателлит- ной ДНК	Начала репли- кации	Реплика- тивные вилки
Нуклеаза + 2 М NaCl	+	+	+
То же с предварительной обработкой раствором с низкой ионной силой	+	—	+
Детергентный метод (при помощи ЛИС)	н. о.	н. о.	н. о.
Нуклеаза в 0,14 М NaCl — экстрак- ция ЭФ в 0,14 М NaCl	н. о.	н. о.	+

Метод выделения ядерного матрикса	Концы единиц тран- скрипции (через топо II)	Область тран- скрипции	Специ- фичность ям ДНК
Нуклеаза + 2 М NaCl	н. о.	+	+
То же с предварительной обработкой раствором с низкой ионной силой	н. о.	—	—
Детергентный метод (при помощи ЛИС)	+	—	+
Нуклеаза в 0,14 М NaCl — экстрак- ция ЭФ в 0,14 М NaCl	н. о.	+	+

Примечание. ЭФ — электрофорез; н. о. — не определяли, «+»
контакт выявляется, «—» — контакт не выявляется

характер. Прикрепления ДНК к скелету ядра идет не по случайным последовательностям, но по участкам, играющим роль в репликации (начала репликации) и транскрипции. Каждая петля поэтому представляет отдельный геномный домен. Наиболее крупными и стабильными струк-

турными доменами являются, вероятно, репликоны: не исключено, что и области терминации репликации присоединены к ядерному скелету. В пределах этих доменов могут возникать вторичные, временные, связанные с транскрипцией контакты. Однако для построения окончательных моделей требуются дополнительные исследования. Ситуация, существующая в настоящее время, схематически представлена на рис. 24. В табл. 3 приведены разные методы изоляции ядерного матрикса и те типы контактов с ДНК, которые выявляются при использовании данных методов.

3.5. Четвертый уровень структуры хроматина — укладывание в метафазную хромосому

Литература: [112, 148]

Хотя вопрос о четвертом уровне компактизации ДНК в хроматине, который выявляется в метафазных хромосомах, еще не решен, можно высказать весьма вероятные предположения. Скорее всего, он зависит от складывания скелетных нитей, нуклеонем, к которым прикреплены петли. Наиболее вероятной является спиральная укладка нитей с образованием соленоида. На шаг этого соленоида должно приходиться около 10 петель и его диаметр должен составлять около 2 мкм, что и соответствует диаметру метафазной хромосомы. Микрофотографии метафазных хромосом, полученные в сканирующем электронном микроскопе, вполне хорошо согласуются с описанными представлениями. Если это так, то изменения хроматина, происходящие при митотическом делении, будут затрагивать в основном скелетные структуры (нуклеонемы), не влияя на более низкие уровни организации хромосомы (нуклеонемная фибрилла, 300 Å-соленоид, петли). Действительно, основной структурой метафазной хромосомы также является 300 Å-фибрилла, а места ее прикрепления к ядерному скелету остаются теми же, что и в интерфазном хроматине.

3.6. Резюме

Итак, хроматин имеет сложную иерархическую организацию, в которой с некоторой долей условности можно выделить четыре уровня. Первый — нуклеосомный — определяется в основном гистонами H2a, H2b, H3 и H4. Они образуют октамер, на который наматывается ДНК (два негативных витка на полную нуклеосому). В итоге образуется 100 Å-нуклеосомная фибрилла. Вторым уровнем — соленоидный (или нуклеомерный) — определяется гистонами H1 и ведет к дальнейшей упаковке 100 Å-фибриллы за счет ее суперспирализации в 300 Å-фибриллу. Детали этой структуры пока не выяснены. Третий уровень — петельный — зависит от прикреплений 300 Å-фибриллы к скелетным белковым структурам хромосом. По-видимому, основной и наиболее стабильный тип связей — это связи через начала репликации. Однако наряду с этим выявляются и другие контакты, носящие временный характер и зависящие от функционального состояния хромосом. Наконец, в основе четвертого уровня укладки, реализующегося в метафазной хромосоме, возможно, лежит гипотетическая пока спирализация (или другой тип складывания) белкового остова хромосомы.

Ясно, что до полного понимания организации хроматина еще очень далеко, и, чем выше уровень структуры, тем больше в нем неясного. Очевидно, что в ходе активации генов, прежде всего при транскрипции, структура хроматина должна претерпевать глубокие изменения. В то же время регуляция транскрипции происходит в значительной мере через изменения в структуре хроматина. К рассмотрению этих вопросов мы и переходим в следующем разделе.

Глава четвертая

РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ ГЕНОВ НА ХРОМОСОМНОМ УРОВНЕ

4.1. Активация гена идет через деконденсацию хроматина

Литература: [149, 150]

Уже давно стало ясно, что при транскрипции гена его организация в хроматине существенным образом меняется, и эти изменения прежде всего выражаются в деконденсации, декомпактизации генетического материала. Ярким примером являются политенные хромосомы дрозофилы. В некоторых органах личинок дрозофилы, например слюнных железах, репликация ДНК не сопровождается митозом и расхождением хромосом. Содержание ДНК в ядре увеличивается в тысячи раз, а число хромосом остается прежним. В этих многонитчатых, или политенных, хромосомах цепи ДНК лежат параллельно друг другу, находясь строго в одном регистре. В каждой цепи ДНК чередуются участки, где хроматиновая фибрилла вытянута, и участки, где она сложена в более компактные структуры. Поскольку все фибриллы находятся в одном регистре, то на хромосоме даже в световой микроскоп видно чередование более плотных участков, **дисков**, и менее плотных **междисковых участков**. На диски приходится существенно больше ДНК. Размеры дисков сильно варьируют, но в среднем каждая молекула ДНК, входящая в состав диска, имеет размер ~ 35 т. п. н. Эта величина близка к размерам петли у *D. melanogaster*, но соответствуют ли диски петлям хромосом, неизвестно. В диске может располагаться один или несколько генов.

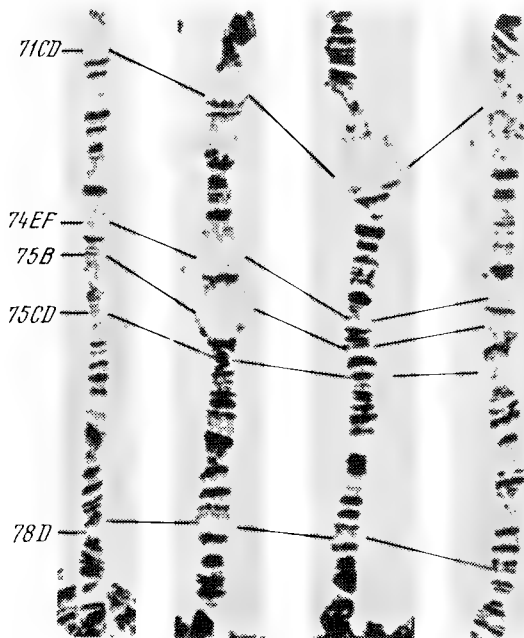


Рис. 25. Серия фотографии участка политенной хромосомы личинок *Drosophila melanogaster* на разных стадиях развития, иллюстрирующая появление и исчезновение пuffed в нескольких областях хромосомы (по результатам, полученным М. Ашбернером)

В политенных хромосомах идет довольно активно транскрипция ряда генов. За ней легко следить, исследуя с помощью авторадииографии включение меченного [^3H] - уридина в хромосомы. Некоторые гены бывают неактивны на одних стадиях и активны на других. При изучении морфологии хромосомы было обнаружено, что активация гена сопровождается резкими изменениями в диске, где этот ген

расположен. Диск увеличивается в размерах, разбухает, и ДНК распределяется в большем объеме (рис. 25). Хроматиновые фибриллы распрямляются и растягиваются вдоль оси хромосомы. Образуется так называемый пуфф. В пуффах происходит активное включение [^3H]-уридина, т. е. там происходит активная транскрипция. Когда транскрипция прекращается, хроматин вновь конденсируется и восстанавливается исходная структура дисков. Таким образом, между транскрипцией и деконденсацией хроматина прослеживается четкая корреляция.

Априорно это выглядит очевидным. Действительно, практически невозможно представить, как РНК-полимераза будет прочитывать ДНК, упакованную вначале в нуклеосомную фибриллу, а затем в соленоид. По крайней мере соленоид (или нуклеомер) должен быть разрушен. Поскольку в образовании соленоида важная роль принадлежит гистону H1, мы рассмотрим прежде всего именно его судьбу при активации гена.

4.2. Изменения в химическом составе хроматина при его активации

Удаление гистона H1 из транскрипционно активного хроматина^{1*2*} [151—154]. В ранних опытах Дж. Боннера (США) было показано, что ДНК в составе хроматина является гораздо худшей матрицей, чем свободная ДНК. На основании этих наблюдений было высказано предположение, что гистоны являются репрессорами транскрипции.

Л. Н. Ананьева и Ю. В. Козлов в нашей лаборатории поставили задачей выяснить, обладают ли ингибирующим действием все гистоны или только некоторые из них. Для этого из хроматина клеток асцитного рака Эрлиха мышей удаляли гистоны экстракцией растворами NaCl с постепенно повышающейся концентрацией. Полученные препараты служили матрицей для синтеза РНК. Транскрипцию вели в присутствии РНК-полимеразы из кишечной палочки,

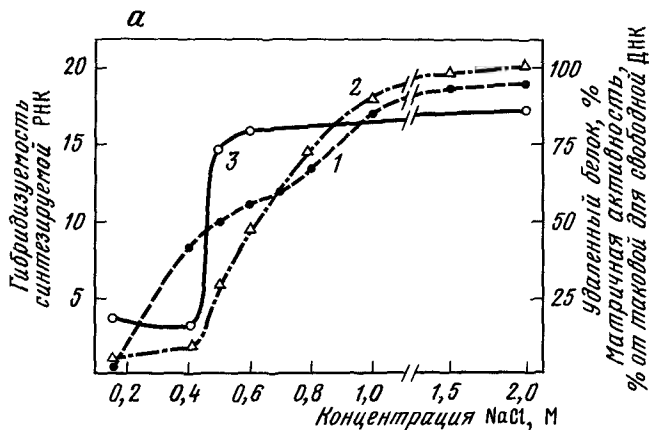
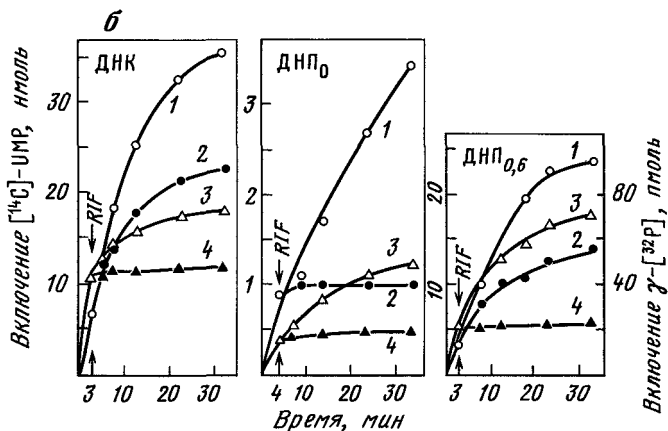


Рис. 26. Влияние гистона Н1 на матричную активность ДНК в составе хроматина

а — влияние удаления белков из хроматина (1) на матричную активность (2) последнего в присутствии экзогенной РНК-полимеразы кишечной палочки, а также на гибридуемость синтезирующейся РНК (3). Гистоны и негистоновые белки экстрагировали растворами NaCl повышающейся концентрации. В интервале 0,4 М NaCl — 0,6 М NaCl избирательно удалялся гистон Н1. Синтезированную РНК гибридизовали с избытком ДНК при промежуточных величинах C_{0t} . Тем самым гибридизуемость выявляет процентное содержание в синтезированной РНК повторяющихся последовательностей (по результатам, полученным Л. Н. Ананьевой, Ю. В. Козловым и автором); *б* — основные параметры синтеза РНК на разных матрицах: свободной ДНК, исходном хроматине (ДНП₀) и хроматине, из которого удален гистон Н1 экстракцией 0,6 М NaCl (ДНП_{0,6}). Синтез РНК вели с помощью РНК-полимеразы кишечной палочки в присутствии меченых нуклеозидтрифосфатов: [^{14}C]-UTP и либо [$\gamma\text{-}^{32}\text{P}$]-АТР, либо [$\gamma\text{-}^{14}\text{C}$]-GTP. [^{14}C]-UMP включалась во всю РНК, а [$\gamma\text{-}^{32}\text{P}$] — только в начало цепи (ppA- или ppG). Иными словами, включение [^{32}P] давало информацию об инициации синтеза, а [^{14}C] — о самом синтезе РНК. В части опытов через 3–4 мин после начала инкубации в среду добавляли рифампицин-антибиотик, препятствующий инициации новых цепей РНК, но не влияющий на уже начатый синтез, т. е. на элонгацию.

1 — включение [^{14}C]-UMP, 2 — то же после добавления рифампицина; 3 — включение [$\gamma\text{-}^{32}\text{P}$]-АТР+GTP, 4 — то же после добавления рифампицина.

На основании этих кривых включения можно рассчитать основные параметры РНК-полимеразной реакции (по результатам, полученным Ю. В. Козловым и автором)



E. coli, которую брали в избытке, и смеси нуклеозидтрифосфатов. В интервале 0,4 - 0,6 М NaCl происходила резкая деконденсация материала, выражающаяся в набухании ядерного геля и даже растворении ДНП (если далее вести механическую обработку). При этом, как было показано, избирательно удалялся гистон Н1. Одновременно с деконденсацией хроматина происходило резкое усиление его матричной активности (рис. 26). Дальнейшее увеличение концентрации солей в экстрагирующем растворе вело к удалению других гистонов и некоторому, но не слишком выраженному дополнительному увеличению матричной активности.

Исследовались также и свойства синтезированной *in vitro* РНК с помощью гибридизации с тотальной ДНК мышей. При этом выявлялась фракция РНК, синтезированная на повторяющихся последовательностях ДНК. Оказалось, что в хроматине транскрипция повторяющихся последовательностей ДНК ограничена. Однако уже после экстракции хроматина 0,6 М NaCl, когда удалялся гистон

H1, гибридизационные свойства РНК, синтезированной на матрице такого хроматина и на матрице свободной ДНК, становились неразличимыми. Мы предположили, что гистоны H2a, H2b, H3 и H4 (тогда их называли иначе — умеренно богатые лизином и богатые аргинином гистоны) не участвуют в подавлении транскрипции, а играют чисто структурную роль в организации хроматина, тогда как гистон H1 (в старой терминологии гистон, богатый лизином) является ингибитором синтеза РНК. Одновременно он же является фактором, обуславливающим конденсацию хроматина (см. выше).

Позднее Ю. В. Козлов изучил механизм ингибирования транскрипции гистоном H1, опять-таки на бесклеточной системе с РНК-полимеразой, выделенной из *E. coli*. Было изучено влияние гистона H1 на процессы инициации и элонгации (см. рис. 26, табл. 4). Оказалось, что он в несколько раз снижает число цепей РНК, иницируемых на матрице нативного хроматина. Особенно резко ингибируется элонгация: РНК-полимераза прочитывает не более 100—150 п. н. ДНК, после чего останавливается. Между

Таблица 4

**Основные параметры РНК-полимеразной реакции
на разных матрицах
(по результатам, полученным Ю. В. Козловым и автором)**

Матрица	Число цепей РНК, иницированных за 3 мин, моль/моль Р ДНК · 10 ⁶	Длина цепи РНК, синтезированной за 33 мин, число нуклеотидов	Скорость роста цепи РНК, нуклеотид/мин	Время роста цепи РНК, мин
ДНК	300	1700	130	>30
ДНП ₀	58	400	140	≤3
ДНП _{0,6}	137	2300	144	>30
ДНП _м *	86	470	—	~5—6

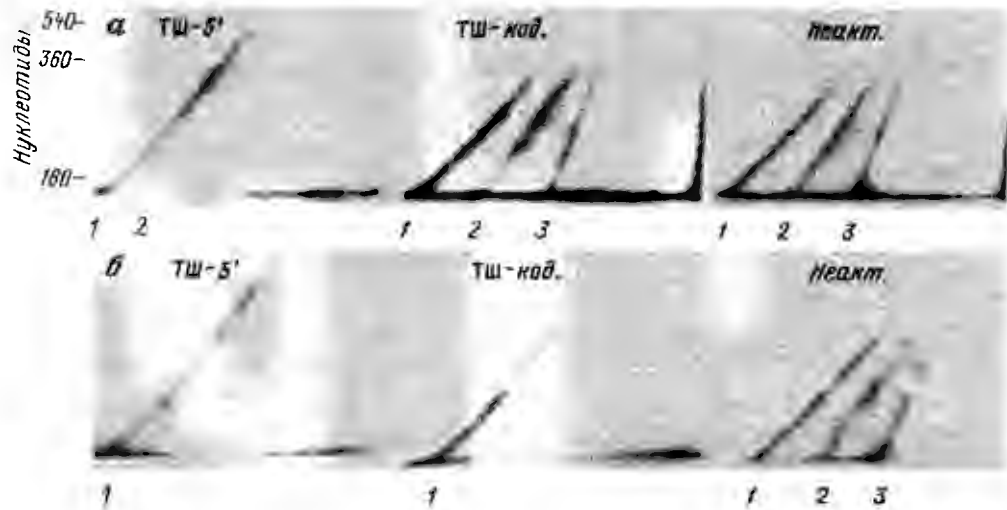
* ДНП_м — ДНП, изолированный с помощью обработки мочевиной, который полностью солюбилизирован, но при этом сохраняет гистон H1.

тем на хроматине, из которого гистон H1 удален, РНК-полимераза прочитывает по несколько тысяч пар нуклеотидов, причем длина цепей не отличается от длины цепей, синтезируемых на матрице свободной ДНК. Правда, на свободной ДНК по сравнению с хроматином, из которого удален гистон H1, более эффективно идут процессы инициации синтеза РНК. Был сделан вывод, что гистон H1, конденсируя хроматин, создает препятствия на пути РНК-полимеразы и останавливает тем самым синтез РНК.

В свете современных данных о соленоидном строении 300 Å-ДНП фибриллы, которое зависит от присутствия гистона H1, этот результат легко объясним. Действительно, в соленоиде РНК-полимераза, очевидно, не может прочесть более 100 п. н. из-за чисто топологических запретов.

Согласно нашей гипотезе, при активации гена должно было происходить удаление гистона H1. Однако проверить ее в то время не удалось. Лишь сравнительно недавно появились данные об утрате гистона H1 из хроматина при активации генов. Так, при выделении активно транскрибируемых областей хроматина, например мини-ядрышек из ряда организмов, в них не был обнаружен гистон H1. Нет его и у дрожжей, где все гены потенциально активны.

Убедительные результаты были получены в лаборатории А. Д. Мирзабекова В. Л. Карповым и О. В. Преображенской. Они разработали метод «гибридизации с тенями гистонов». Для этого ДНК сшивали с гистонами с помощью диметилсульфата в условиях, когда пришивается в среднем одна молекула гистона на отрезок ДНК длиной около 200 – 300 п. н. Затем ДНК фрагментировали и проводили двумерный электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия. После прогона в первом направлении разрушали пришитые к ДНК гистоны протеиназой и вели разгонку во втором направлении уже свободной ДНК. Так как при первом раунде электрофореза разные гистоны по-разному замедляли движение фрагментов ДНК, то после второго прогона выявлялось несколько диагоналей



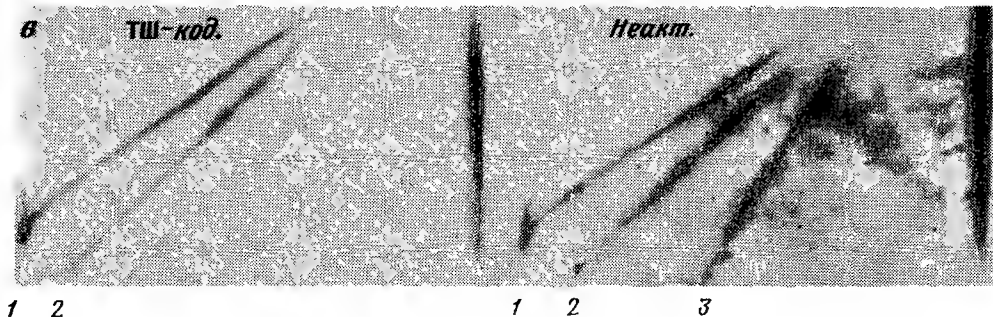


Рис. 27. Утрата гистона Н1 и сердцевинных гистонов при активации транскрипции

Опыты велись на клетках культуры *D. melanogaster* (а, б) в условиях культивирования при 25° (а) и теплового шока (б). В случае а экспрессия генов теплового шока отсутствует, в случае б — идет весьма активно. Кроме того, опыты велись на дехорионизованных эмбрионах (в), где экспрессия генов теплового шока находится на среднем уровне. После образования ДНК-белковых комплексов, выделения фрагментов ДНК, их двумерного разделения (в вертикальном направлении после удаления белка) и переноса на фильтр вели гибридизацию одних и тех же фильтров с разными пробами: с регуляторной областью гена р70 теплового шока (ТШ-5'), с кодирующей областью того же гена (ТШ код), с пробой транскрипционно неактивной инсерции в ген рДНК (неакт.) В неактивном гене видны три диагонали; 1 — свободная ДНК, 2 — комплексы ДНК с гистонами октамера; 3 — комплексы ДНК с гистонами Н1. Видно ослабление или исчезновение ДНК-гистоновых комплексов при активации хроматина (по результатам, полученным А. Д. Мирзабековым и соавт.)

(рис. 27). Обычно хорошо видны три: одна, соответствующая исходно свободной ДНК, другая — исходным комплексам ДНК с сердцевинными гистонами и третья (нижняя) — исходному комплексу ДНК с гистонами Н1. Полученные ДНК переносятся на фильтр и гибридизуются с той или иной пробой. Если для гибридизации брали неактивный участок генома, например спейсер рибосомного гена дрозофилы, то метка связывалась со всеми диагоналями. Если, однако, как пробу использовали ген теплового шока, который транскрибировался в клетках, из которых выделяли хроматин, то гибридизация с диагональю, соответствующей комплексам ДНК с гистонами Н1, была резко ослаблена или вообще отсутствовала. Иными словами, в ядрах перед пришивкой ДНК транскрибируемого гена не имели контактов с гистонами Н1.

Хотя все имеющиеся сейчас данные, взятые по отдельности позволяют и другие интерпретации, в совокупности они служат серьезным свидетельством в пользу удаления гистона Н1 из активного хроматина. Однако механизм этого процесса пока совершенно неясен.

Судьба нуклеосом при активации хроматина^{2*} [154 – 157]. Менее однозначным является вопрос о судьбе гистонов Н2а, Н2b, Н3 и Н4, формирующих сердцевину нуклеосомы. В вышеупомянутых опытах Ю. В. Козлова их присутствие практически не влияло на транскрипцию ДНК РНК-полимеразой из *E. coli*. При изучении продуктов гидролиза хроматина эукариот многие авторы нашли, что нуклеосомы содержат ДНК активных генов, т. е. последние тоже организованы в нуклеосомы. Полученные на большом экспериментальном материале данные А. Д. Мирзабекова и сотр. показывают, что нуклеосомы, содержащие активно транскрибируемую ДНК, принципиально устроены так же, как и нуклеосомы, содержащие неактивную ДНК, хотя некоторые ДНК-гистоновые контакты в них изменяются.

Были также проведены опыты по гибридизации с тенями гистонов, о которых шла речь в предыдущем разделе

(см. рис. 27). Препараты с диагоналями готовили из клеток дрозофилы, в которых гены теплового шока либо вообще не работали, т. е. были выключены, либо они работали на низком уровне, или, наконец, они были стимулированы тепловым шоком к активной транскрипции. Во всех случаях контрольной пробой служила ДНК спейсера рибосомного гена, которая гибридизовалась во всеми тремя диагоналями, в том числе с диагональю, произошедшей из комплексов ДНК с сердцевинными гистонами.

Ген теплового шока тоже нормально гибридизовался с этой диагональю из клеток, где он не транскрибировался. Однако с материалом, полученным из клеток с умеренной транскрипцией гена теплового шока, гибридизация второй диагонали была существенно понижена. Наконец, если диагонали получали из клеток с очень активным синтезом мРНК теплового шока, то вторая диагональ при гибридизации вообще была не видна (как и третья), и выявлялась лишь диагональ, соответствовавшая не сшитой с гистонами ДНК. Общий вывод, сделанный из работ с использованием метода ДНК-белковых сшивок, состоял в том, что при транскрипции движущаяся вдоль цепи ДНК РНК-полимераза обратимо сталкивается с нуклеосомами с ДНК и транскрибирует фактически голую ДНК. Если уровень транскрипции невысок и РНК-полимераза, ползущих вдоль ДНК, немного, то нуклеосомы успевают образоваться вновь на участке, через который РНК-полимераза уже прошла. Если же транскрипция идет активно, то нуклеосомная структура ДНК не успевает восстановиться, и ДНК вообще лишена гистонов. В то же время постулируется, что организация нуклеосом в активном хроматине практически не отличается от таковой в неактивном. Недавно А. Д. Мирзабеков и сотр. воспроизвели опыты по пришивке гистонов к ДНК с помощью другого метода, путем обработки изолированных ядер препаратами платины. Этот метод мягче диметилсульфатного. Были получены принципиально те же результаты.

Наряду с этой группой данных имеются исследования, в которых авторы приходят к несколько отличным выводам. В. Гаррард и А. Ворсел (США), изучая состояние активных генов в хроматине с помощью нуклеазного гидролиза и с помощью электронной микроскопии, пришли к выводу о том, что нуклеосомы в активном хроматине остаются, но претерпевают структурные изменения типа разворота, превращаясь в полунуклеосомы. В результате на электрофореграммах гидролизатов микрококковой нуклеазой периодичность ~ 200 п. н. заменяется периодичностью ~ 100 п. н. При электронной микроскопии число бусин удваивается, а их размеры уменьшаются. Предполагается, что РНК-полимераза может проходить через такие развернутые нуклеосомы.

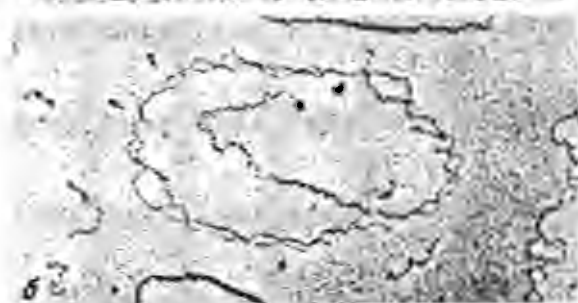
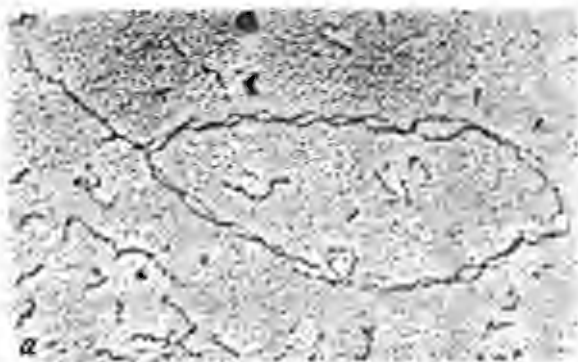
В пользу этой возможности говорят и данные, полученные Т. Коллером (Швейцария). Им разработан оригинальный метод изучения нуклеосом. Клетки обрабатывают псораленом, веществом, которое связывается с ДНК, и затем при УФ облучении сшивает между собою две цепи ДНК. Однако если ДНК входит в состав нуклеосом, реакции ее с псораленом не происходит. Поэтому, если выделенную из обработанных клеток ДНК проденатурировать в присутствии формальдегида (он препятствует ренатурации ДНК), то при электронной микроскопии на ДНК видны чередующиеся пузырьки (две цепи денатурировавшей ДНК), соответствующие нуклеосомам, связанные между собою ординарными нитями (сшитая, не способная к денатурации ДНК), соответствующими межнуклеосомным линкерам. Вначале изучали активно транскрибируемые гены рибосомной РНК, входящие в состав экстрахромосомных структур и поэтому легко анализируемые с помощью электронной микроскопии. В них пузырьки, соответствующие нуклеосомам, не видны, т. е. по всей вероятности, гистоны полностью удаляются из транскрибируемых областей. Интересно, что в нетранскрибируемых областях, спейсерах, пузырьки в ДНК (нуклеосомы) хорошо видны.

Однако на мини-хромосомах SV40, которые транскрибируются РНК-полимеразой II, а не РНК-полимеразой I, как гены рибосомной РНК, были получены другие результаты (рис. 28). Транскрипционно активные мини-хромосомы выявляются благодаря наличию на них растущих цепей РНК (обычно одной или двух). Такие мини-хромосомы составляют 1—2 % от всех мини-хромосом, выделенных из клетки. Они, однако, содержат то же самое число пузырьков, что и неактивные мини-хромосомы, причем их размеры одинаковы в обоих случаях. Наиболее интересным является то, что цепи РНК отходят как от линкеров, так и непосредственно от пузырьков, т. е. РНК-полимераза, очевидно, транскрибирует нуклеосомы. Эти данные свидетельствуют в пользу разворота нуклеосом и транскрипции их РНК-полимеразой.

Все перечисленные выше результаты не являются прямыми, и поэтому окончательное решение вопроса о судьбе нуклеосом при транскрипции должны дать будущие эксперименты.

Модификация гистонов и гистоновые варианты: связь с активным хроматином [158, 159]. Еще в начале 60-х годов Олфри (США) показал, что гистоны могут подвергаться различным модификациям. Так, гистон H1 фосфорилируется по ϵ -аминогруппам лизинов. Гистоны H3 и H4 ацетируются по тем же группам. Имеется и ряд других модификаций (метилирование, ADP — рибозилирование, убикитинирование и др.).

Сразу возникло предположение, что энзиматические модификации гистонов могут влиять на структуру хроматина и на его активность. Действительно, при фосфорилировании лизина происходит замена одного положительного заряда в гистоне на отрицательный, при ацетилировании — утрата положительного заряда и т. д. Именно благодаря таким изменениям в заряде модифицированные гистоны можно отделить от немодифицированных при проведении гель-электрофореза в ацетатном буфере с мочеви-



ной. Так, в высокоразрешающем электрофорезе гистон H4 дает не одну, а четыре полосы, соответствующие молекулам, не ацетилированным и ацетилированным по одному, двум и трем остаткам лизина. В разных тканях соотношение между фракциями меняется. Разделяются на несколько фракций гистоны H3, H2a, H2b и H1 (разная степень ацетилирования и фосфорилирования).

К сожалению, до настоящего времени отсутствуют хорошие методы разделения транскрипционно активного и неактивного хроматина и поэтому трудно приписать измененные формы гистонов тому или иному состоянию хроматина. Наиболее интересные данные в этом направлении были получены тем же В. Олфри (США). При гидролизе активного хроматина он выделил необычные частицы, которые седиментировали в сахарозном градиенте медленнее, чем обычные нуклеосомы, и, по мнению автора, соответствовали развернутым нуклеосомам. В этих частицах, названных А-частицами, присутствовали все сердцевинные гистоны. В отличие от нормальных нуклеосом SH-группы гистона H3 в А-частицах были доступны для ряда химических реагентов, и благодаря этому А-частицы можно отделить от нуклеосом с помощью фракционирования на колонках с хлормеркурибензоатом (реагент, связывающий SH-группы). В А-частицах повышено содержание ацетилированных форм гистонов. Автор предполагает, что ацетилирование гистонов при активации хроматина ведет к развороту нуклеосомных частиц, а это, в свою очередь, повышает доступность SH-групп гистона H3.

Некоторые из гистонов кодируются более чем одним

Рис 28 Электронно-микроскопическое изучение транскрипции в минихромосомах SV40

Препараты ДНК после сшивки мини хромосом псораленом и денатурации. Нуклеосомы, в которых сшивка ДНК не происходит, выглядят как пузырьки. Видно (стрелки) что цепи РНК могут отходить как от нуклеосом (а б), так и от линкеров (в). Треугольники показывают свободную от нуклеосом зону (по результатам, полученным Г. Коллером и соавт.)

типом генов. В результате для этих гистонов существует несколько вариантов, немного различающихся по своей аминокислотной последовательности. Иногда в процессе онтогенеза происходит закономерная замена одного подкласса гистона на другой. Остается, однако, неясным, имеет ли это какое-либо регуляторное значение. Вопрос, очевидно, может быть также решен после разработки адекватных методов выделения транскрипционно активного хроматина.

Особое положение занимает гистон H1. Для него существуют варианты, резко отличающиеся по своей структурной организации. Таким вариантом является, например, гистон H5, который замещает значительную часть гистона H1 в ядрах эритроцитов птиц. По всей вероятности, это замещение является важным фактором полного выключения транскрипции в ядрах эритроцитов. В обычных клетках существует вариант гистона H1 — гистон H1⁰. Его содержание составляет малую долю от всего гистона H1. Есть ряд противоречащих друг другу данных о том, что H1⁰ связан с активными генами или, наоборот, с устойчиво выключенными генами. Вопрос остается открытым.

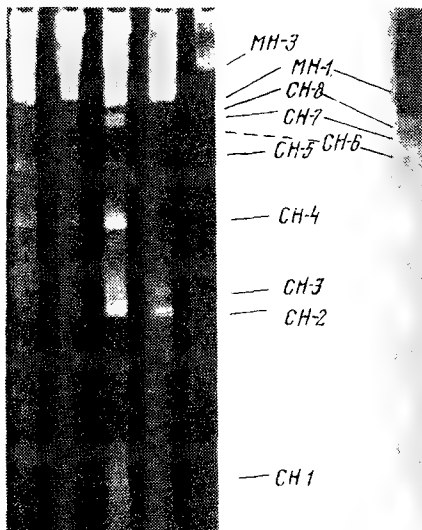
Белки HMG могут участвовать в организации активного хроматина^{1*} [160—166]. Помимо гистонов, хроматин содержит множество негистоновых белков, функция которых не известна. Среди них, очевидно, должны быть структурные белки, ферменты, обеспечивающие протекание процессов репликации, транскрипции и др., и регуляторные белки. Э. Джонс (Великобритания) попытался выделить белковые компоненты, присутствующие в достаточно большом количестве, что позволило бы провести их анализ и идентификацию. Ему действительно удалось изолировать новый класс ядерных белков, названный им «группой белков с высокой подвижностью» (high mobility group), или HMG-белки. Название зависело от высокой подвижности этих белков при электрофорезе в геле. Фракция HMG-белков распадается на ряд индивидуальных компо-

нентов. Среди них наиболее представительны и хорошо охарактеризованы НМG-1, НМG-2, НМG-14 и НМG-17.

НМG-белки имеют невысокую молекулярную массу. Они обогащены как основными, так и дикарбоновыми аминокислотами. Содержание НМG-белков составляет примерно $1/10$ от содержания гистонов. В ядрах из разных типов клеток оно может варьировать. В данном контексте нас больше всего интересуют белки НМG-14 и НМG-17, для которых были получены данные о возможной роли в активации транскрипции. Х. Вайнтрауб (США) показал, что экстракция ядер 0,35 М NaCl, которая извлекает НМG-белки, меняет некоторые свойства активного хроматина, которые восстанавливаются при добавлении к хроматину НМG-14 и НМG-17. Г. Диксон (Канада) обнаружил эти белки в составе нуклеосом, освобождавшихся из хроматина на ранних этапах гидролиза нуклеазой, которые, по его данным, были обогащены ДНК тракстипционно активных генов.

В. В. Бакаев в нашей лаборатории пришел к выводу о роли НМG-белков в транскрипции с помощью другого экспериментального подхода. При электрофоретическом анализе гидролизатов хроматина он выявил, помимо нуклеосом и олигонуклеосом, минорные компоненты, обладающие большей подвижностью. Они были названы субнуклеосомами и, очевидно, являлись продуктами дальнейшего распада нуклеосомы (рис. 29, табл. 5). Субнуклеосома СН-7 соответствовала нуклеосоме, утратившей по одной молекуле Н2а и Н2b и содержавшей ДНК, укороченную на 40 п. н., СН-6 соответствовала комплексу ДНК длиной 30–40 п. н. с гистоном Н1, отщепляющемуся от МН-2 при ее превращении в МН-1. СН-4 содержала отрезок ДНК и пару гистонов Н2а и Н2b (продукт реакции МН-1 → СН-7 + СН-4). Две субнуклеосомы, СН-3 и СН-2, состояли из короткой ДНК и НМG-белков (НМG-14 и НМG-17). Можно было предположить, что они являются участками линкера, связанными с белками НМG-14 и НМG-17, пере-

а



б

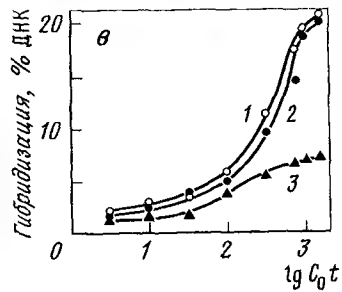
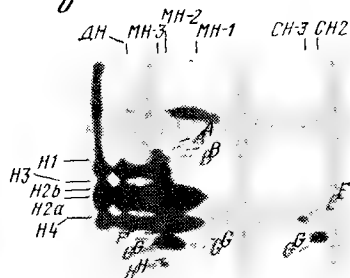


Рис 29. Возможная связь НМГ белков (14 и 17) с активным хроматином

а выделение субнуклеосом в гидролизатах хроматина микрококовой нуклеазой. На разных этапах гидролиза появляются те или иные фракции субнуклеосом. Электрофорез велся в полиакриламидном геле в неденатурирующих условиях. Окраска этидийбромидом, на правом столбике флюорография, б использование двумерного электрофореза для выяснения белкового состава субнуклеосом СН2 и СН3. Хроматин, меченный [¹⁴C] по белку, гидролизовали микрококовой нуклеазой и разделяли двумерным электрофорезом (1 с направление недиссоциирующая среда, 2 с направление раствор додецилсульфата натрия), после чего вели автораддиографию для выявления белков. Буквами указаны НМГ-белки, которые в момент проведения опыта еще не были идентифицированы с известными. Сейчас мы знаем, что А это НМГ-1, В НМГ 2, Е НМГ-14, G НМГ-17. НМГ-белки Е и Н идентифицированы неогно, вероятно, Н тоже соответствует НМГ-17. Видно, что НМГ белки входят в состав моноклеосом (МН 2 и МН 3) и субнуклеосом СН-2 (НМГ-17) и СН-3 (НМГ-14); в демонстрации обогащения ДНК СН 2 и СН-3 транскрибирующимися последовательностями ДНК, выделенную из полос СН-2 и СН-3 L-клеток, метили по 5' концам [³²P] и затем гибридизовали с гяРНК из L-клеток. Гибриды выявляли путем гель-фильтрации

1 - СН 2 ДНК; 2 - СН-3 ДНК; 3 - тотальная ДНК клетки (по результатам В. В. Бакаевым и соавт.)

ходящими в раствор при переваривании соответствующих нуклеосом. СН-2 и СН-3 были собраны, из них выделена ДНК, которую метили по концам и изучали ее гибридизацию с ядерной РНК. Оказалось, что ДНК из СН-2 и СН-3 гораздо эффективнее гибридизуется с ядерной РНК, чем тотальная, фрагментированная до тех же размеров ДНК клетки.

Отсюда был сделан вывод, что ДНК, связанная с белками НМГ-14 и НМГ-17, вероятно, происходит из транскрипционно активного хроматина.

Все эти данные, полученные независимо, позволили предположить, что НМГ-14 и НМГ-17 каким-то образом связаны с активацией генов. Механизм активации был, однако, совершенно непонятным. НМГ-14 и НМГ-17 не могли быть первичными факторами, включающими ген, так как они лишены специфичности. Можно было думать, что они участвуют в поддержании «открытой конформации» активного хроматина.

В последующие годы появился скептицизм относительно роли НМГ-14 и НМГ-17 в активации хроматина.

Таблица 5.

Состав субнуклеосом
(по результатам, полученным В. В. Бакаевым и соавт.)

Название субнуклеосомы	Длина фрагмента ДНК, п. н.	Гистон	HMG-белок
CH-1	20	—	—
CH-2	25—30	—	17
CH-3	25—30	—	14
CH-4	40	1× (H2a, H2b)	—
CH-5	40—50	1× (H3, H2a, H2b)	?
CH-6	30—40	H1	—
CH-7	105	1× (H2a, H2b) 2× (H3, H4)	—
CH-8	125	»	—

В частности, недавно А. Д. Мирзабеков и сотр. с помощью метода гибридизации с белковыми тканями получили данные об обеднении активного хроматина HMG-14 и HMG-17. Поскольку, однако, все вышеперечисленные данные являются косвенными, в целом вопрос о роли HMG-белков остается открытым и требует дальнейшего изучения.

Топоизомераза I и белки, прочно связанные с ДНК, входят в состав транскрипционно активного хроматина^{1*} [167]. С. Элгин (США), а за нею ряд других авторов показали, что транскрипционно активный хроматин содержит топоизомеразу I, фермент, релаксирующий суперспирализованную ДНК. Впервые это было продемонстрировано на цитологических препаратах политенных хромосом дрозофилы с помощью флюоресцирующих антител к топоизомеразе I. Этот фермент вносит в ДНК одноцепочечный разрыв и ковалентно связывается с образовавшимся 5'-концом ДНК. Это позволяет ДНК свободно вращаться в месте разрыва. Затем фрагмент отщепляется, а фосфодиэфирная связь в ДНК восстанавливается. По молеку-

лярной массе топоизомераза I, или сокращенно топо I, гетерогенна. Наиболее тяжелый компонент имеет молекулярную массу 135 кДа, а наиболее богато представленный — 80 кДа. При ее расщеплении протеиназами образуются более короткие полипептиды, сохраняющие тем не менее ферментативную активность.

Антибиотик каптотецин является ингибитором топо I, причем при обработке им клеток фермент образует ковалентные сшивки с ДНК в том месте, где он находился в момент контакта с антибиотиком. Место таких сшивок легко определить методом картирования с помощью гибридационной метки. Этим путем было обнаружено, что топо I присутствует исключительно в транскрибируемых областях генома, т. е., вероятнее всего, она работает в кооперации с РНК-полимеразой II, снимая возникающие при транскрипции местные перекручивания ДНК.

Другим белковым компонентом, выявляемым в транскрибируемых областях генома, является набор белков, прочно связанных с ДНК (ПСБ), которая соответствует транскрибируемой ДНК клетки (см. разд. 3.4).

С. В. Разиным и В. В. Чернохвостовым была сделана попытка детально охарактеризовать комплексы ДНК с ПСБ. Фрагменты ДНК длиной в 1—2 т. п. н., связанные с ПСБ, очищали и подвергали равновесному ультрацентрифугированию в градиенте плотности CsCl. Их плавучая плотность оказалась равной $1,7 \text{ г/см}^3$, т. е. она соответствовала плавучей плотности свободной ДНК, не содержащей белка. В ходе опытов, поставленных для объяснения этого парадокса, было обнаружено, что обработка ДРНКазой ведет к уменьшению плавучей плотности комплексов до $1,62\text{—}1,65 \text{ г/см}^3$. Приблизительные расчеты, основанные на плотности белка ($\sim 1,3 \text{ г/см}^3$) и РНК ($\sim 1,9 \text{ г/см}^3$), показывают, что на каждую молекулу ДНК приходится около 150 кДа белка и около 200 нуклеотидов РНК. Природа этой РНК неясна, но получены данные о ее гомогенности и уникальной нуклеотидной последовательности.

Таким образом, многое в отношении комплексов ДНК с ПСБ остается загадочным, но, по всей вероятности, им принадлежит существенная роль в организации транскрипционной машины. Их исследование продолжается в настоящее время.

Деметилирование ДНК в транскрибирующихся генах ^{2*} [168—172]. Еще одной важной особенностью активного хроматина является деметилирование определенных участков ДНК. В неактивных генах большая часть цитидиловых остатков в составе CG-последовательностей метилируется. Впервые Б. В. Ванюшиным в лаборатории А. Н. Белозерского было продемонстрировано, что ДНК в разных тканях одного животного различаются по уровню метилирования С. На основании этого было высказано предположение о возможной регуляторной роли метилирования в дифференцировке. Позднее многими авторами было показано, что в транскрибирующейся ДНК некоторые области оказываются неметилированными. Наиболее широко используемый метод анализа — сравнение рестриктных карт, полученных с рестриктазами, узнающими одну и ту же последовательность, например CGCG или CCGG, но обладающими разной чувствительностью к метилированию. Одна из рестриктаз расщепляет и метилированную и неметилированную последовательности, а другая — только неметилированную. Обычно неметилированные последовательности локализованы в регуляторной области гена. Область собственно гена, его кодирующей части и интронов одинаково метилирована как в работающих, так и в молчащих генах.

При введении в клетки метилированной ДНК ее экспрессия в клетке оказывается значительно сниженной по сравнению с неметилированной ДНК. Получены данные, согласно которым при репликации ДНК состояние метилирования ДНК воспроизводится: если одна из цепей метилирована, то новообразованная цепь также метилируется в том же самом месте.

Одно время складывалось впечатление, что метилирование—деметилирование цитидина в СG-последовательностях регуляторной области—это главный механизм инактивации—активации гена. Однако в последнее время появился ряд данных, противоречащих этой гипотезе. Так, полностью метилированная по СG ДНК SV40 активно экспрессируется. В то же время в ДНК дрозофиллы вообще не выявляется метилцитозин. Возможно, что деметилирование С является следствием активации гена и лишь закрепляет состояние транскрипционной активности. Здесь, как и в других областях изучения активации гена, нужны новые эксперименты

4.3.^{2*} Характерные свойства транскрипционно активного хроматина — чувствительность и гиперчувствительность к ДНКазе I и свободная от нуклеосом зона

Литература: [173—180]

Х. Вайнтрауб обнаружил, что материал активных генов более быстро переваривается ДНКазой I, чем хроматин, содержащий неактивные гены. Разница — чисто количественная, но хорошо воспроизводимая. Феномен был подтвержден многими авторами. Оказалось также, что и другие нуклеазы быстрее атакуют активный хроматин. Это его свойство было названо «повышенной чувствительностью к ДНКазе I». Возможным и наиболее тривиальным ее объяснением является более открытая конформация активного хроматина. Естественно, 100 Å-фибрилла должна атаковываться нуклеазами легче, чем 300 Å-соле-ноид.

Интересно, что повышенная чувствительность к ДНКазе I появляется до того, как происходит активация транскрипции, т. е. связанная с нею «активная конформация хроматина» не является следствием уже идущей транскрипции, но предшествует таковой. Другой интерес-

ной особенностью является то, что область повышенной чувствительности к ДНКазе I распространяется далеко за пределы гена, иногда на десятки тысяч пар нуклеотидов. Таким образом, изменение конформации хроматина (деконденсация?) захватывает не только сам активный ген, но значительно больший домен, в состав которого он входит (возможно, петлю, прикрепленную к ядерному скелету, см. разд. 3.4).

Другое важное свойство активного хроматина — это существование областей, свободных от нуклеосом и гистонов. Некоторыми авторами было показано, что обычно перед генами, более или менее совпадая с энхансерами и другими регуляторными последовательностями, располагаются области ДНК, не организованные в нуклеосомы. При электронной микроскопии в этих участках не видно бусин на нитях. Те же самые области ДНК, но в клетках, где соответствующие гены зарепрессированы, имеют типичную нуклеосомную организацию.

В лаборатории А. Д. Мирзабекова с помощью описанного выше метода гибридизации с теньями гистонов (см. разд. 4.2) показано, что регуляторная область гена теплового шока дрозофилы не содержит ни гистона H1, ни гистонов сердцевины: диагонали, соответствовавшие комплексам ДНК с гистонами, совсем не гибридизовались с пробой, содержавшей регуляторную область. Интересно, что даже в клетках, где транскрипция генов теплового шока не идет и где все три диагонали (ДНК, ДНК+гистоны сердцевины и ДНК+гистон H1) нормально связываются с ДНК самого гена, гибридизация с пробой из регуляторной области выявляет только диагональ свободной ДНК. Постоянное существование свободной от гистонов регуляторной области у генов теплового шока связано с тем, что эти гены потенциально активны, — они немедленно включаются под воздействием теплового шока или другого стресса.

В случае генома вируса SV40, хотя транскрибируется

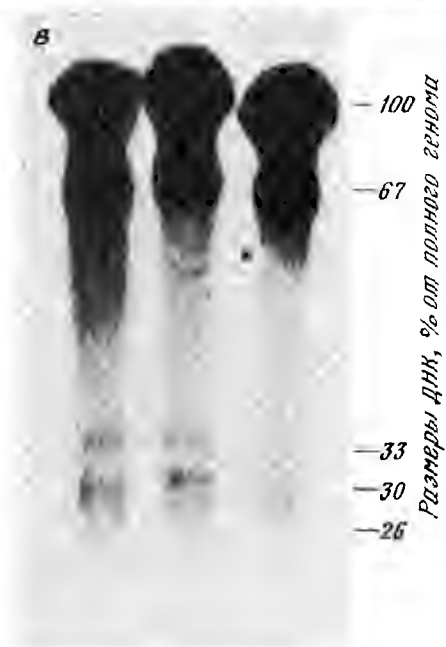
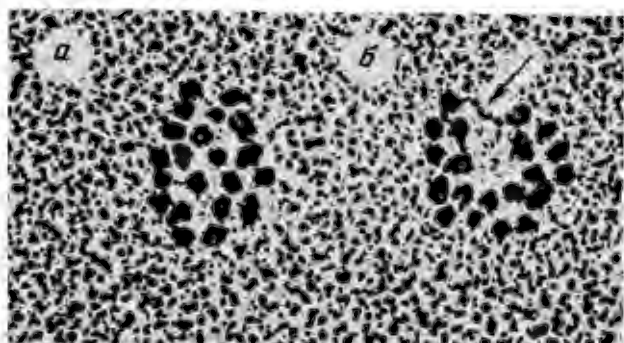
лишь 2—5 % всех молекул, около 20 % мини-хромосом имеют свободную от нуклеосом область — это, очевидно, потенциально активные мини-хромосомы. У остальных 80 % мини-хромосом регуляторная область, как и другие участки генома, организована в нуклеосомы (рис. 30).

Третьей характерной особенностью активного хроматина является гиперчувствительность к ДНКазе I. Это явление заключается в раннем появлении под воздействием ДНКазы I двухцепочечных разрывов в строго определенных участках гена. ДНКазы I обычно вносит в ДНК одноцепочечные разрывы и поэтому появление двухцепочечных разрывов при переваривании свободной ДНК происходит лишь на поздних стадиях гидролиза. Здесь же такие разрывы появляются на ранних этапах переваривания хроматина.

Впервые феномен был описан на генах теплового шока дрозофилы К. Ву (США), который применил метод картирования с помощью гибридизационной метки.

Сейчас сайты гиперчувствительности к ДНКазе I обнаружены для множества разных генов. Обычно таких мест бывает несколько. Очень часто они локализуются в области энхансеров, а также и рядом с другими регуляторными элементами. Иногда часть сайтов сохраняется и в неактивном хроматине, однако многие из них можно выявить только в том случае, если данный ген транскрибируется или по крайней мере находится в потенциально активном состоянии. В мини-хромосоме вируса SV40 несколько сайтов гиперчувствительности к ДНКазе I располагаются в регуляторной области, свободной от нуклеосом (см. рис. 30).

Интересно, что, как показал Х. Вайнтрауб, в областях энхансеров ДНК в составе активного хроматина подвергается также атаке нуклеазой S1, которая обычно гидролизует только одноцепочечную ДНК. Это указывает на наличие определенных нарушений в монотонной структуре ДНК в области энхансеров. Причины гиперчувстви-



тельности к ДНКазе I и чувствительности к ней и нуклеазе S1 обсуждаются в следующих разделах (см. разд. 4.4 и 4.5).

4.4. Регуляторные белки, связывающиеся с энхансерами и другими контролирующими элементами генов

Литература: [181—186]

За последние годы стремительно накапливаются данные о существовании специфических белков, взаимодействующих с регуляторными областями различных генов.

К выявлению таких белков существуют различные подходы. Один из них - это детекция белка, связывающегося с определенной областью ДНК непосредственно в хроматине. Для этого в регуляторную область хроматина вносят разрыв с помощью той или иной эндонуклеазы, например с помощью рестриктазы, и от этой точки начинают гидролизовать ДНК экзонуклеазой. В том месте, где находится белок, связанный с ДНК, переваривание экзонуклеазой прекращается или резко замедляется. Ход гидролиза экзонуклеазой определяется электрофоретически по изменению размеров рестриктных фрагментов, гибридизующихся с соответствующей пробой. Таким образом удастся определить границы области, занятой на ДНК тем или иным белком.

Рис. 30. Выявление свободной от нуклеосом зоны в мини-хромосомах вируса SV40

а-б электронная микроскопия мини-хромосом вируса SV40, выделенных в 0,1 М NaCl после напыления. Приведены фотографии мини-хромосом, лишенной (*а*) и содержащей (*б*) безнуклеосомную зону, *в* выявление участков гиперчувствительности к ДНКазе I. Ядра инфицированных вирусом SV40 клеток обрабатывали ДНКазой I в мягких условиях, выделяли ДНК, обрабатывали эндонуклеазой EcoRI и после электрофореза гибридизовали с меченой ДНК SV40. Видно появление дискретных фрагментов с длиной ~67 % и 33-26 % от всего генома, что соответствует положению области, свободной от нуклеосом (по результатам, полученным М. Янивом и др.)

Другой подход — это выявление в ядерных экстрактах белков, способных специфически связываться с определенными участками ДНК. Для этого экстракты, выделяемые обычно из ядер с помощью 0,2 — 0,4 М солевых растворов, инкубируют с клонированными фрагментами меченой ДНК в присутствии избытка немеченой неспецифической ДНК (например, из *E. coli*). Комплексы ДНК с белками выявляют либо путем их сорбции на нитроцеллюлозных фильтрах, либо наблюдая замедление миграции данного фрагмента при гель-электрофорезе. Зная рестриктивный фрагмент, с которым специфически взаимодействуют белки ядерного экстракта, можно далее выявить участки этого фрагмента, защищаемые связанным белком от атаки нуклеазами (ДНКазой I, экзонуклеазой) или химическими агентами (например, диметилсульфатом). Для этого после мягкой обработки расщепляющими агентами фрагменты ДНК (меченные предварительно по одному концу) разделяют с помощью электрофореза в геле вместе с обработанными тем же методом препаратами свободной ДНК. Сравнивая полученные наборы продуктов расщепления, легко определить участки ДНК, защищаемые белком с точностью до одного нуклеотида (рис. 31).

Следующий этап эксперимента — это выделение белка на аффинных колонках, содержащих соответствующую ДНК. Этот этап необычайно труден, так как содержание белков, узнающих специфические последовательности ДНК, исключительно низкое. Между тем выделение белка пока является необходимым этапом как для изучения его биологической активности, так и для последующего клонирования, для которого надо или иметь антитела к белку, или знать последовательность какого-либо из его пептидов. Тогда можно выявить соответствующий клон либо иммунологически, либо гибридизацией с химически синтезированной олигонуклеотидной пробой.

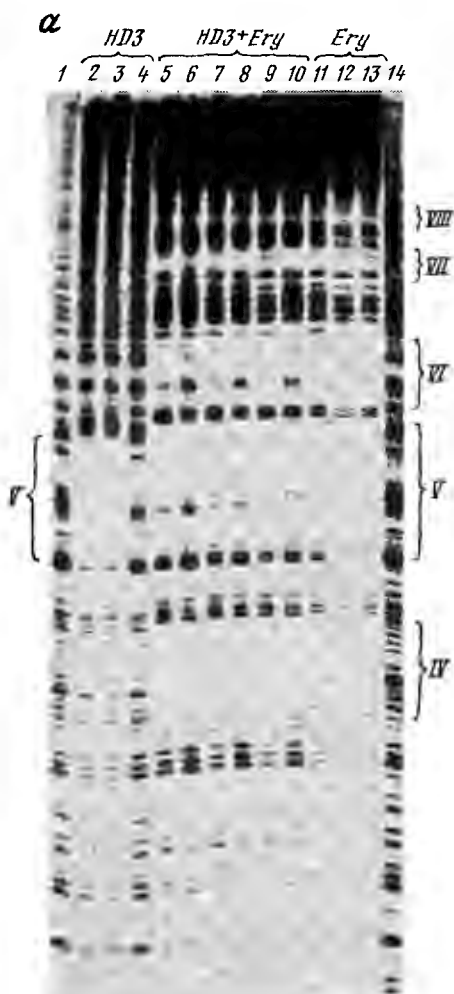
Работа по этой схеме ведется во многих лабораториях, и достигнуты значительные успехи. Прежде всего, пока-

зано, что регуляторные области всех изученных генов содержат защищенные участки, отличные по организации от нуклеосом. Эти защищенные участки во многих случаях совпадают с консервативными областями, присутствующими во многих генах, мутации в которых существенным образом сказываются на работе гена. Сюда относятся ТАТА-блок, СААТ-блок и ССГССС-блок, т. е. основные области промотора. В энхансерах защищенными во многих случаях опять-таки оказываются консервативные сердцевинные последовательности, составляющие основу модулей энхансеров.

Эти результаты были получены как в опытах по связыванию *in vitro*, так и при изучении защиты ДНК в составе хроматина. Интересно, что в последнем случае белки выявляются лишь в том случае, когда соответствующий ген транскрипционно активен. По крайней мере в ряде случаев гиперчувствительность активного гена к ДНКазе I может быть объяснена наличием специфических регуляторных белков. Они защищают блоки регуляторной зоны от ДНКазы I, оставляя в то же время небольшие отрезки ДНК экспонированными. Эти участки будут, естественно, атаковываться ферментами в первую очередь, и в них легко будут возникать близко расположенные разрывы в противоположных цепях, что приведет к двухцепочечному разрыву.

Все же, видимо, не вся гиперчувствительность к ДНКазе I может быть объяснена таким образом (см. разд. 4.5.).

Приведу несколько примеров. Одним из первых регуляторных белков был фактор транскрипции РНК-полимеразой III, открытый Д. Брауном (США) и названный им TFIIIA. Он специфически связывается с промоторной областью генов, транскрибируемых РНК-полимеразой III, и обеспечивает затем их непрерывную транскрипцию. Интересно, что гистон H1 препятствует связыванию TFIIIA и блокирует транскрипцию. Однако если комплекс



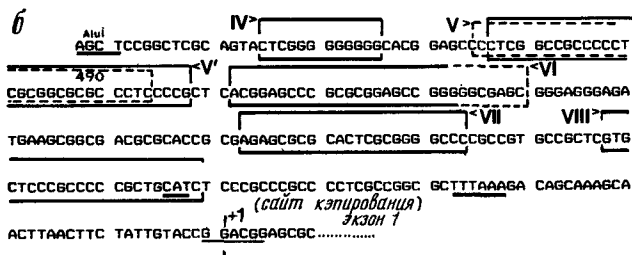


Рис. 31. Защита участков ДНК специфически связывающимися белками от ДНКазы I.

Опыты велись с фрагментом ДНК, содержащим область начала гена тус (ген, участвующий в регуляции размножения клеток) и лежащие перед ним участки ДНК, начинающиеся с сайта рестриктазы Alu I. Фрагменты были помечены [³²P] по 5'-концу в Alu сайте. Их непосредственно обрабатывали малыми дозами ДНКазы I (1, 14) или перед обработкой ДНКазой I инкубировали с белками ядерного экстракта из клеток культуры эритробластов (HD3, 2—4), из клеток эритроцитов (Егу, 11—13) или совместно двумя экстрактами (HD3+Егу, 5—10). В разных опытах брали разные количества белков, а также добавляли немеченую чужую ДНК в качестве конкурента. Полученные после обработки ДНКазой I препараты ДНК подвергали электрофорезу в денатурирующих условиях и далее автордиографии (а). Видно, что белки ядерных экстрактов защищают от атаки ДНКазой I разные области фрагмента, обозначаемые римскими цифрами (IV—VIII). Эти области отмечены на нуклеотидной последовательности фрагмента (б). Белки экстракта из эритроидных клеток связываются с зоной V, а из эритроцитов с зонами IV, V', VI, VII и VIII (по результатам, полученным В. В. Лобаненковым и соавт.)

уже образовался, то гистон H1 не способен вытеснять TFIIIA и на транскрипцию не влияет.

Изолирован еще ряд белков, связывающихся с распространенными по геному нуклеотидными последовательностями. Это белок Sp1, взаимодействующий с CCGCCC-блоком, ядерный фактор, связывающийся с CAAT-блоком, и рецепторы стероидных гормонов, реагирующие с энхансерами зависимых от гормонов генов. Важно подчеркнуть, что в системах *in vitro* описанные белки часто обладают активирующим транскрипцию действием, что подтверждает их регуляторную функцию.

Что касается других регуляторных белков, в частности тех, которые узнают индивидуальные энхансеры, то их удастся идентифицировать, но пока еще не удастся получать в достаточных количествах. Тем не менее, поскольку проблема чисто техническая, она будет, несомненно, решена в ближайшем будущем, по крайней мере для тех систем, для которых получение исходного клеточного материала не является проблемой.

Кроме того, можно ожидать создания новых оригинальных систем отбора, которые позволят вести селекцию генов регуляторных белков на основании новых принципов. Уже сейчас, например, у дрозофилы известны супрессорные мутации, которые, очевидно, затрагивают гены регуляторных белков. Один из генов-супрессоров уже проклонирован, а другие, вероятно, будут проклонированы в ближайшее время. Таким образом, можно будет миновать длинный путь через изоляцию белков.

Итак, в настоящее время стремительно развиваются исследования белков, узнающих специфические последовательности ДНК и выполняющих функции регуляции транскрипции. Имеющийся материал еще недостаточен для обобщений и в любом случае эти обобщения быстро устареют. Ясно лишь, что именно на этом пути можно прежде всего ожидать решения многих вопросов о механизмах контроля активности гена, вопросов ключевых для понимания клеточной дифференцировки.

4.5.^{1*} Упругие торзионные напряжения в ДНК в составе активного хроматина и их возможная роль в регуляции транскрипции

Еще одной особенностью транскрипционно активного хроматина, возможно объясняющей ряд его свойств, является наличие в его ДНК эластических торзионных, или вращательных, напряжений. Мы остановимся на этом вопросе несколько подробнее.

Понятие торзионного напряжения в ДНК [187]. Если ДНК имеет ковалентно замкнутую структуру, будь то кольцевая ДНК в случае эукариотических вирусов (например, SV40) или ДНК с концами, фиксированными на ядерном скелете (хромосомная ДНК эукариот), в ней легко могут возникать торзионные напряжения. Уже упоминалось, что ДНК образует по два негативных витка на нуклеосомный повтор. Если убрать гистоны, то двуспиральная положительно закрученная ДНК окажется дополнительно негативно суперспирализованной (левые супервитки). Возникновение суперспирализации связано с возрастанием свободной энергии, пропорционально квадрату числа супервитков, а значит, система будет стремиться к уменьшению их числа. Это в принципе может произойти одним из двух способов. Первый способ — небольшое раскручивание двойной спирали ДНК по всей ее длине. Так, для удаления одного левого супервитка на 200 п. н. надо, чтобы угол между соседними основаниями в двойной спирали ДНК уменьшился на $1,8^\circ$. Однако тот же эффект может быть достигнут и другим способом — за счет перехода ДНК в другую конформацию на каком-то коротком участке.

За последние годы показано, что ДНК может иметь разные конформации, помимо классических правозакрученных *B* и *A* форм (*B*-форма ~ 10 п. н. на виток; *A* ~ 11 п. н. на виток). Наиболее сильно отличается от них *Z*-форма, левозакрученная двойная спираль, легко возникающая в последовательностях с чередующимися пуриновыми и пиримидиновыми основаниями (CGCGCG... и GTGTGT...). На шаг спирали ДНК приходится ~ 8 п. н. Поэтому при переходе из *B*-формы в *Z*-форму на один нуклеотид закрутка уменьшается от $+36^\circ$ до -45° , т. е. примерно на -80° . Следовательно, переход 10-нуклеотидной последовательности из *B*-формы в *Z*-форму приведет к исчезновению 10 негативных (левых) суперспиральных витков. Переход из *B*-формы в *A*-форму (изменение угла между основаниями примерно на 3°)

на участке в 100 п. н. поглотит один супервиток и т. д.

Экспериментальные данные подтверждают существование таких переходов. В неперекрученной («релаксированной») кольцевой молекуле ДНК, скажем SV40, Z-форма отсутствует. Однако после внесения в нее негативных супервитков она появляется в областях, где есть чередующиеся пуриновые и пиримидиновые основания, в частности, в регуляторной области.

В клетке есть специальные ферменты, влияющие на топологию ДНК: топоизомераза I и топоизомераза II. Механизм действия топоизомеразы I описан выше (см. раздел 4.2). Она обратимо разрывает одну из цепей ДНК.

Топоизомераза II (топо II) при своем действии разрывает обе цепи ДНК и протаскивает одну ветвь двухцепочечной ДНК через разрыв в другой. В результате также происходит сбрасывание супервитков в молекуле ДНК. Топоизомераза II играет важную роль в репликации, обуславливая, в частности, разъединение реплицировавшихся дочерних ДНК, которые при инактивации этого фермента остаются сцепленными.

Используя обработку топо I в присутствии бромистого этидия, можно получать негативно суперспирализованную ДНК. Дело в том, что бромистый этидий внедряется плоскостью своего кольца между основаниями ДНК, в результате чего происходит уменьшение угла сдвига между соседними основаниями и в результате — раскручивание двойной спирали ДНК. Топо I фиксирует эту равновесную ситуацию. Когда топо I и бромистый этидий удаляют, кольцевая ДНК восстанавливает, хотя и не полностью, свою исходную структуру, и одновременно в ней появляются негативные супервитки. Меняя концентрацию бромистого этидия при обработке топо I, можно получить разную степень суперспирализации. Финальная равновесная структура ДНК будет включать определенное число супервитков плюс вызванные суперспирализацией конформационные изменения в разных участках молекулы.

Торзионное напряжение ДНК в транскрипционно активном хроматине ^{1*} [188, 189]. При депротеинизации ДНК мини-хромосом вируса SV40 она негативно суперспирализована. То же самое справедливо и для ДНК петель хроматина. Это не удивительно, поскольку в хроматине ДНК намотана на нуклеосомы, давая около двух негативных витков на нуклеосому (т. е. $\sim$ на 200 п. н.).

Однако, как показали исследования лабораторий Б. Хирта (Швейцария) и П. Шамбона (Франция), ДНК в составе хроматина находится в релаксированном состоянии, она не имеет упругих напряжений. Это связано именно с ее намоткой на нуклеосомы, где взаимодействия с гистонами полностью компенсируют ее напряжение.

Основной эксперимент заключался в следующем. Выделенные мини-хромосомы вируса SV40 обрабатывали топо I, затем выделяли из контрольных и обработанных ферментом мини-хромосом ДНК и сравнивали их с помощью высокоразрешающего электрофореза в агарозном геле, при проведении которого происходит разрешение топоизомеров ДНК, т. е. две одинаковые ДНК, различающиеся всего на один супервиток, видны как две разные дискретные полосы. Оказалось, что ДНК, выделенные из обработанных топо I и контрольных мини-хромосом, содержат одинаковые наборы топоизомеров, обе негативно закручены и вообще неразличимы между собою. Следовательно, топо I не вносила изменений в ДНК, когда последняя была в составе мини-хромосомы. Отсюда вытекает, что ДНК в составе хроматина находится в равновесном, энергетически наиболее выгодном состоянии, и упругие торзионные напряжения в ней отсутствуют.

Однако, исходя из ряда косвенных теоретических соображений, можно было предполагать, что в транскрипционно активном хроматине ситуация иная. Поэтому А. Н. Лучин из лаборатории И. Б. Збарского и В. В. Бакаевым предприняты опыты по ревизии вышеописанных данных (рис. 32).

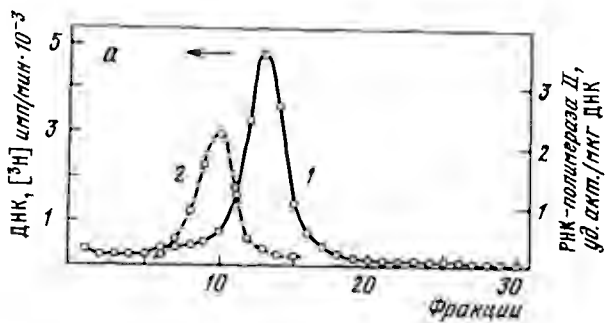
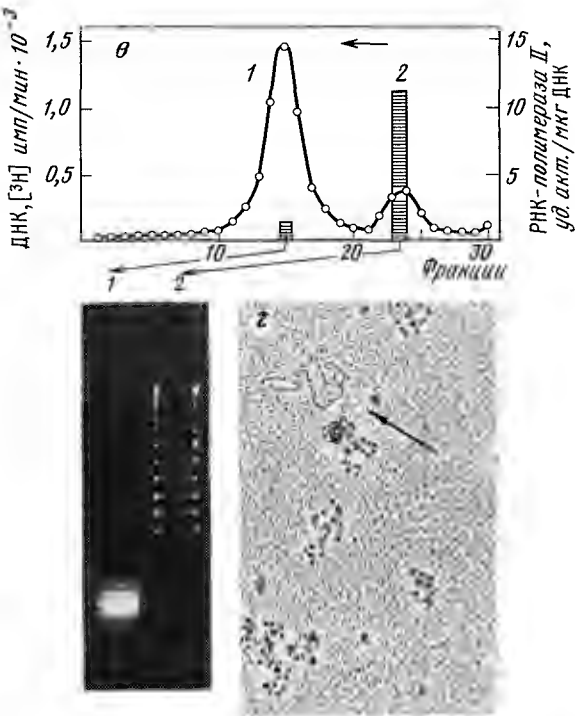


Рис. 32. Торсионные напряжения в ДНК транскрипционно активных мини-хромосом вируса SV40



а — седиментация в сахарозном градиенте мини-хромосом вируса SV40, меченных $[^3\text{H}]$ тимидином (1). В разных фракциях определяли эндогенную активность РНК-полимеразы II после лизиса в саркозиле (2). Видно, что тяжелое плечо пика обогащено транскрибирующими молекулами. Мини-хромосомы экстрагировали 0,4 М NaCl и наслаивали на сахарозный градиент в 0,2 М NaCl. *б* — высокоразрешающий гелевый электрофорез ДНК мини хромосом до и после обработки топоизомеразой I: 1 — ДНК из необработанных мини-хромосом; 2 — ДНК мини-хромосом, инкубированных в 0,2 М NaCl 2 ч при 37°; 3, 4 — ДНК мини хромосом, обработанных топоизомеразой I в 0,2 М NaCl при 37° и 4° соответственно; 5, 6 — ДНК мини-хромосом, обработанная топоизомеразой I после выделения, при 37° и 4° соответственно. Видно, что ДНК небольшой части мини-хромосом (2–5 %) полностью релаксирует при обработке топо I, так же как и вся свободная ДНК. Электрофорез вели в присутствии эгидийбромида, в результате чего релаксированная ковалентно замкнутая ДНК приобретала положительные (правые) супервитки

в — реседиментация в сахарозном градиенте материала из тяжелой зоны пика (см. *а*) после его обработки топоизомеразой I. Видно появление небольшого мед

Из клеток, инфицированных вирусом SV40, выделяли клеточные ядра и из них экстрагировали мини-хромосомы 0,4 М NaCl. Условия экстракции (0,4 М NaCl) были выбраны таким образом, чтобы в раствор хотя бы частично перешли транскрибирующиеся мини-хромосомы, которые при экстракции 0,14 М NaCl остаются практически полностью связанными с ядрами (вероятно, за счет прикрепления к ядерному матриксу). Мини-хромосомы очищали ультрацентрифугированием через сахарозный градиент и либо сразу выделяли из них ДНК, либо предварительно обрабатывали их топо I. В контрольном опыте обрабатывали топо I уже выделенную ДНК. После этого все препараты подвергали высокоразрешающему электрофорезу и сравнивали их между собою. В необработанных мини-хромосомах ДНК представлена серией суперспирализованных топоизомеров. После обработки свободной ДНК топо I она полностью релаксировалась, сохраняя ковалентную замкнутость. Поскольку электрофорез велся в присутствии бромистого этидия, ДНК приобретала положительные супервитки — наиболее верхнее положение занимает ДНК с разрывом в одной цепи, которая релаксирована в любых условиях. Если мини-хромосомы предварительно обрабатывали топо I, то с основной частью ДНК ничего не происходило — она оставалась суперспирализованной (в соответствии с данными других авторов). Однако ДНК небольшой фракции мини-хромосом полностью релаксиро-

Рис. 32 (окончание)

ленно седиментирующего пика 2. Столбики указывают эндогенную активность РНК-полимеразы в пиках 1 и 2, измеренные в присутствии саркозила. В нижней части рисунка приведены электрофореграммы ДНК из пиков 1 и 2. Вся ДНК пика 1 суперспирализована, а пика 2 — релаксирована. Из этого следует, что релаксируемые мини-хромосомы обогащены транскрибирующимися молекулами. Материал пика 2 существенно обеднен белками по сравнению с пиком 1, т. е. релаксация ДНК в мини-хромосомах сопровождается потерей значительной части белка; 2 — электронная микроскопия мини-хромосом SV40 из (Б). Кроме обычных структур типа бусин на нити (0,7–0,9 мкм длиной), видны гладкие фибриллы длиной ~1–2 мкм. После обработки топоизомеразой они исчезают и вместо них появляется свободная ДНК (~1,7 мкм длиной) (по результатам, полученным А. Н. Лучником и В. В. Бакаевым)

валась (оставаясь ковалентно замкнутой), подобно свободной ДНК SV40. Эта фракция составляла от 2 до 5 % от всей ДНК. Очевидно, что ДНК в этой фракции мини-хромосом находилась в состоянии эластического торзионного напряжения уже в составе хроматина.

При повторном ультрацентрифугировании обработанных топо I мини-хромосом в сахарозном градиенте появляется небольшой дополнительный более медленно седиментирующий пик. Оказалось, что в нем сосредоточена вся релаксировавшая ДНК мини-хромосом. Материалы этого пика и основного компонента были собраны, обработаны саркозилем, чтобы убрать гистоны и не связанную с ДНК РНК-полимеразу, и помещены в среду для синтеза РНК. В этих условиях молекулы РНК-полимеразы II, уже начавшие в клетке синтез РНК, продолжают его. Оказалось, что удельная активность РНК-полимеразы II, рассчитанная на единицу ДНК, в минорном пике значительно выше, чем в главном. Следовательно, упругие торзионные напряжения — это свойство транскрипционно активных мини-хромосом. При релаксации торзионно напряженных мини-хромосом они теряют значительную часть белка, с чем и связано уменьшение их седиментации при ультрацентрифугировании.

Каким образом в транскрипционно-активных мини-хромосомах генерируются упругие торзионные напряжения? Вопрос этот остается открытым, но можно рассмотреть некоторые возможные механизмы. Один из них — это уже обсуждавшееся выше (см. разд. 4.2) разворачивание нуклеосом в тяж или в полунуклеосомы. При этом легко можно представить возникновение упругих напряжений в развернутой структуре. Поскольку суперспиральные витки проявиться при этом не могут, то напряжение может быть полностью поглощено вторичной структурой ДНК (переходы $B \rightarrow Z$, $B \rightarrow A$ или др.).

Другая возможность — это ослабление взаимодействий между ДНК и октамером, например, за счет модификации

гистонов и уменьшения положительного заряда. Число супервитков ДНК при этом не изменится, но появятся эластические напряжения, в связи с которыми структура станет менее устойчивой и будет релаксировать при снятии топологических запретов.

Третья возможность — это утрата гистонов из мини-хромосомы, например, за счет вытеснения другими белковыми факторами или «сталкивании» нуклеосом РНК-полимеразой. Хотя нам эта возможность представляется менее вероятной, поскольку уровень транскрипции на мини-хромосомах SV40 невысок, ее нельзя сбрасывать со счетов.

В пользу первой возможности говорят данные о «полунуклеосомах» (см. разд. 4.2). В наших препаратах мини-хромосом SV40 при электронной микроскопии можно было видеть небольшое число кольцевых молекул, которые по длине (1,2 мкм) занимали промежуточное положение между свободной ДНК SV40 (1,7 мкм) и обычными мини-хромосомами типа бусинок на нити (0,7 мкм). Они выглядели как тяжи более толстые, чем свободная ДНК, и лишённые нуклеосомной структуры. После обработки топо I они исчезали, но при этом появлялась свободная ДНК. Весьма вероятно, что эти молекулы содержали развернутые нуклеосомы и обладали торзионными напряжениями.

Очевидно, в целом вопрос требует дальнейшего изучения. Наши данные о существовании торзионных напряжений в активном хроматине нашли подтверждение в последующих работах ряда других авторов. А. Ворсел и сотр. (США) показали, что ДНК транскрипционно активных мини-хромосом в овоцитах лягушки находится в состоянии торзионного напряжения. Авторы установили, что введенные в ядра овоцитов лягушки мини-хромосомы далее выявляются либо в форме, связанной с ядерным остовом (предположительно транскрипционно активные мини-хромосомы), или в растворимой форме. После микроинъекции топо I ДНК связанных мини-хромосом релаксировала, а в растворимых мини-хромосомах она оставалась суперспирализованной. Таким образом, благодаря микроинъек-

циям удалось преодолеть технический барьер, связанный с трудностями экстракции транскрипционно активного материала из ядер (см. разд. 4.2), и вести опыт в условиях более близких к условиям *in vivo*, чем в наших экспериментах.

Опыты Х. Вайнтрауба (США) по чувствительности активных генов к нуклеазе S1 (см. разд. 4.3) можно интерпретировать как косвенное указание на наличие торзионных напряжений в ДНК. Действительно, в модельных опытах на свободной ДНК чувствительность к нуклеазе S1 появляется в результате связанных с суперспирализацией локальных изменений в конформации ДНК. Наконец, связь между степенью суперспирализации ДНК и транскрипционной активностью была получена в опытах с плазмидами дрожжей.

Следует упомянуть, что некоторые авторы выступили с данными, противоречащими изложенным выше. Однако в их опытах были использованы условия эксперимента, не позволяющие извлечь истинные транскрибирующиеся мини-хромосомы из комплекса с ядерным матриксом.

Ряд свойств активного хроматина может зависеть от торзионного напряжения ДНК ^{1*} [189—194]. Одним из важных свойств активного хроматина является наличие сайтов гиперчувствительности к ДНКазе I (см. разд. 4.3). А. Н. Лучник и В. В. Бакаев исследовали вопрос, каково соотношение между торзионно напряженными мини-хромосомами SV40 и мини-хромосомами, гиперчувствительными к ДНКазе I (рис. 33). Гиперчувствительные мини-хромосомы выявляли по образованию линейной ДНК после обработки малыми дозами ДНКазы I. Оказалось, что если обработать мини-хромосомы сначала ДНКазой I (в условиях, когда большая часть ДНК не получала даже одноцепочечных разрывов, но гиперчувствительные к ДНКазе I молекулы становились линейными), то при последующей обработке топо I релаксированная ДНК не образовывалась. Если же вначале обработать мини-хромосомы топо I, то полностью исчезали мини-хромосомы,

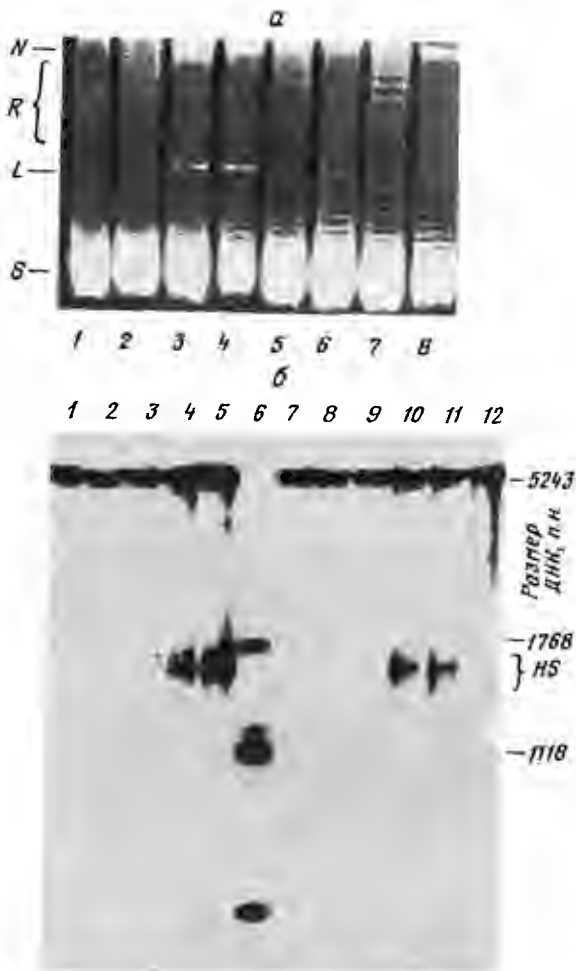
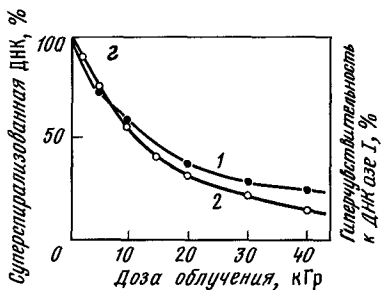
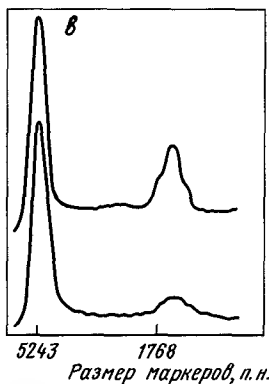


Рис. 33. Зависимость гиперчувствительности мини-хромосом к ДНКазе I от торзионных напряжений в ДНК



а — опыты с последовательной обработкой мини хромосом топо I и ДНКазой I. Высокора разрешающий электрофорез ДНК из мини-хромосом вели в 1,6%-ном агарозном геле в присутствии бромистого этидия (0,01 мкг/мл). 1 — ДНК из исходных мини-хромосом; 2 — обработка мини-хромосом топо I; 3 — обработка ДНКазой I (малые дозы); 4, 6 — обработка ДНКазой I, добавление ЭДТА (ингибирует ДНКазу I) и затем обработка топо I; 5, 7 — обработка топо I и затем ДНКазой I; 8 — обработка свободной ДНК SV40 ДНКазой I (та же доза), S — суперспирализованная ДНК; L — линейная ДНК; возникает в результате гиперчувствительности мини-хромосом к ДНКазе I (разрыв обеих цепей ДНК в одном и том же месте); R — релаксированная ковалентно замкнутая ДНК (в присутствии бромистого этидия она приобретает некоторую правую суперспирализацию); N — ДНК с одноцепочечным разрывом или разрывами; она становится кольцевой релаксированной молекулой, но не способна закручиваться в присутствии бромистого этидия (основная часть ее возникает под действием ДНКазы I). Видно, что после обработки мини-хромосом топо I исчезает гиперчувствительность к ДНКазе I и, наоборот, мягкая ДНКазная обработка удаляет релаксируемые мини-хромосомы; б — ингибирующее действие рентгеновского облучения изолированных ядер из инфицированных вирусом SV40 клеток обезьяны (CV 1) на гиперчувствительность мини-хромосом к ДНКазе I. Ядра в физиологической концентрации солей обрабатывали ДНКазой I, выделяли ДНК, обрабатывали рестриктазой EcoRI и после электрофореза и переноса на фильтр гибридизовали с EcoRI-MspI фрагментом ДНК SV40. Фрагмент с размером ~1700 п. н. образуется при этом за счет двухцепочечных разрывов, внесенных в ДНК ДНКазой I, т. е. его наличие отражает гиперчувствительность мини-хромосом к ДНКазе I. 1 — 5 — гидролиз необлученных ядер возрастающими дозами ДНКазы I; 7 — 11 — то же, но после рентгеновского облучения ядер; 6 — маркеры; 12 — ДНК SV40; в — сканирование образцов 5 и 11. Видно примерно четырехкратное снижение гиперчувствительности к ДНКазе I под влиянием рентгеновского облучения; г — зависимость гиперчувствительности ДНК (1) SV40 от дозы рентгеновского облучения изолированных ядер. Дана также кривая внесения одноцепочечных разрывов в ДНК SV40, которые определяли по появлению кольцевой релаксированной ДНК (2) (по результатам, полученным А. Н. Лучником и В. В. Бакаевым)

гиперчувствительные к ДНКазе I. Отсюда вытекает, что релаксируемые, или торзионно напряженные, мини-хромосомы и мини-хромосомы, гиперчувствительные к ДНКазе I, представляют собою одну и ту же фракцию мини-хромосом в препаратах, полученных с помощью 0,4 М NaCl. Можно было также предположить, что гиперчувствительность к ДНКазе I зависит от торзионных напряжений в ДНК, так как она утрачивалась после релаксации.

Недостатком описанных опытов явилось то, что в них мини-хромосомы изолировали с помощью 0,4 М NaCl, который мог удалять из них ряд белков. Поэтому в следующей серии опытов релаксацию ДНК мини-хромосом SV40 вели непосредственно в изолированных ядрах при физиологических концентрациях солей. Агентом, вызывающим появление в ДНК одноцепочечных разрывов, служило рентгеновское облучение. После облучения ядра обрабатывали ДНКазой I, выделяли из них ДНК, обрабатывали ее рестриктазой EcoRI и разделяли электрофоретически. После переноса на фильтр выявляли путем гибридизации с соответствующей пробой из генома SV40 двухцепочечные разрывы в регуляторной зоне мини-хромосомы SV40, сделанные ДНКазой I.

Оказалось, что рентгеновское облучение ядер в 3—4 раза подавляет гиперчувствительность регуляторной зоны мини-хромосомы SV40 к ДНКазе I (см. рис. 33). С увеличением дозы облучения снижается содержание суперспирализованной ДНК SV40 в ядрах и пропорционально идет падение гиперчувствительности к ДНКазе I. Не вся гиперчувствительность исчезает при внесении одноцепочечного разрыва в ДНК. Около одной четверти ее сохраняется до конца. Ясно, однако, что основная часть гиперчувствительности к ДНКазе I требует сохранения суперспиральной ДНК, т. е., очевидно, является функцией от торзионных напряжений в мини-хромосоме.

Зависимость от торзионных напряжений другого характерного свойства активного хроматина, а именно повышен-

ной чувствительности к ДНКазе I, было показано в опытах Г. Мартинсона (США). Он использовал γ -облучение живых клеток и показал, что чувствительность к ДНКазе I глобинного гена при этом резко падает. Для эффекта было достаточно внести один одноцепочечный разрыв на отрезок ДНК длиной примерно 20—30 т. п. н. Эта величина совпадает с размерами областей ДНК, которые становятся чувствительными к ДНКазе I при активации гена (см. разд. 4.3).

Таким образом, мы видим, что ряд свойств транскрипционно активного хроматина теряется, если индуцировать тем или иным способом релаксацию ДНК, входящей в его состав.

Необходимо ли торзионное напряжение ДНК для поддержания транскрипции?^{1*} [195—197]. Возникает круциальный вопрос, необходимо ли поддержание торзионных напряжений в хроматине для того, чтобы в нем протекала транскрипция. Некоторые ранние данные М. Бирнстила (Швейцария) и специальные опыты Х. Вайнтрауба (США) показали, что, по крайней мере в случае плазмид, несущих гистоновый ген или ген тимидинкиназы, для активной транскрипции после инъекции в овоциты лягушки необходимо, чтобы они были ковалентно замкнуты. Рестрикция таких мини-хромосом блокировала их транскрипцию. Чтобы перебросить мост к клеточному хроматину, А. Н. Лучник провел эксперименты по влиянию рентгеновского облучения на транскрипцию. Облучение проводилось в таких дозовых интервалах (обычно от 5 до 100 крад), чтобы вызвать редкие одноцепочечные разрывы в ДНК (в среднем один разрыв на участок от 10 до 250 т. п. н.). Оказалось, что в клетках культуры тканей разного происхождения пропорционально увеличению дозы облучения происходило почти полное (до 95 %) подавление включения метки в РНК (рис. 34). Подавлялся синтез как гетерогенной ядерной РНК (про-мРНК), так и рибосомной РНК. Существенно, что размер транскриптов под влиянием облу-

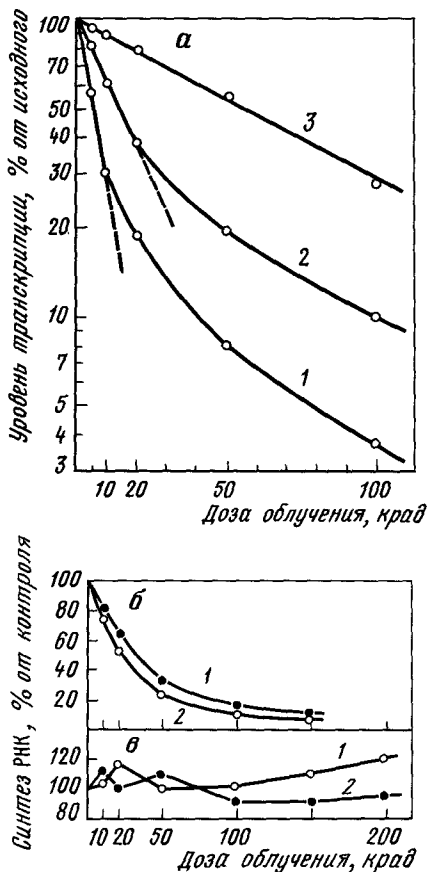
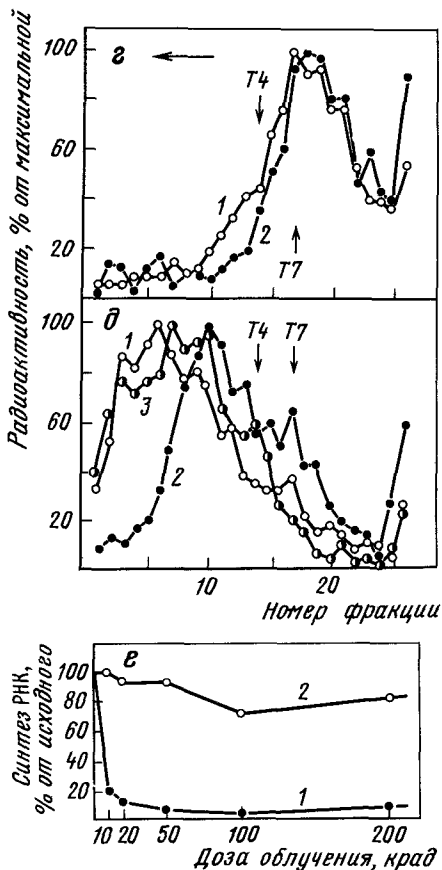


Рис. 34. Действие рентгеновского облучения на транскрипцию
 а — подавление синтеза РНК в клетках CV-1 после облучения при 0° (1), 37° (2) и при облучении при 0° с последующей двухчасовой инкубацией при 37° (3). После описанных процедур клетки инкубировали с $[^3\text{H}]$ уридином в течение 5 мин;
 б — ингибирование синтеза общей (в основном рибосомной) РНК (1) и гяРНК (2). Синтез последней измерялся в присутствии актиномицина D (0,05 мкг/мл);



в отсутствие ингибирования рентгеновским облучением синтеза РНК в изолированных ядрах в присутствии сульфата аммония (1) или саркозила (2);

г определение размеров РНК, синтезированной в течение 4 мин после облучения клеток CV-1. РНК подвергали ультрацентрифугированию в градиенте сахарозы в денатурирующем растворе; 1 - РНК из контрольных клеток, 2 - РНК из клеток, облученных дозой 50 крад. Видно, что облучение не сказывается на размерах синтезированной после этого РНК; д - определение числа одноцепочечных разрывов

чения практически не изменялся опять-таки в случае как рРНК, так и про-мРНК. Следовательно, блок синтеза РНК шел по закону все или ничего: или транскрипция в данной транскрипционной единице шла нормально, или она полностью блокировалась.

Чтобы проверить состояние самой «транскрипционной машины», выделяли ядра и после частичного или полного удаления гистонов экстракцией 0,25 М сульфатом аммония или саркозилем определяли в них уровень транскрипции. Оказалось, что в этих условиях транскрипция вообще не изменялась под влиянием облучения. Следовательно, транскрипционная машина была в порядке, в самой ДНК-матрице никаких препятствий не возникало, и, скорее всего, транскрипция подавлялась в результате структурных перестроек в хроматине под влиянием одноцепочечных разрывов в ДНК, ведущих к релаксации торзионно напряженного активного хроматина. Можно предположить, что при этом происходит замена развернутых нуклеосом «нормальными» неактивными хромосомами. Однако пока это чисто гипотетическое предположение.

Измеряя молекулярную массу денатурированной ДНК из исходных и облученных клеток, можно определить число одонитевых разрывов в ДНК и приблизительно рассчитать средний размер мишени, одноцепочечный разрыв в которой инактивирует в ней транскрипцию. Оказалось, что для клеток млекопитающих он составляет 100—200 т. п. н. Эти величины несколько выше, чем определяемые биохимическими методами размеры петли (см. разд. 3.4), но до-

Рис. 34 (окончание)

вов в ДНК после облучения клеток. Использовался тот же метод, что и в г: 1 — ДНК из контрольных клеток; 2 — ДНК из клеток, облученных дозой 20 крад при 37°, 3 — то же, но после дополнительной инкубации в течение 40 мин при 37° (репарация разрывов). Т4 и Т7 — положение маркеров ДНК фазов Т4 и Т7. Видно, что число одноцепочечных разрывов в ДНК после облучения весьма невелико и уменьшается в ходе репарации. с — нечувствительность синтеза РНК у E. coli к рентгеновскому облучению. Приведены кривые зависимости от дозы облучения синтеза РНК в клетках куриных эритробластов (1) и E. coli (2). Облучение вели при 0°, включение [H]-уридина — 4 мкс при 37° (по результатам, полученным А. Н. Лучников и соавт.)

вольно хорошо соответствуют размерам репликонов. В то же время можно вспомнить, что именно начала репликации формируют наиболее устойчивые участки прикрепления ДНК к ядерному скелету (см. разд. 3.4). Весьма вероятно, что именно репликоны и представляют собою независимые топологические домены ДНК.

Интересно, что чувствительность транскрипции к рентгеновскому облучению у данного вида хорошо коррелирует со средними размерами репликонов, а также с размерами петель, определенными разными методами. Соответствующие результаты приведены в табл. 6. Корреляция между размерами топологических доменов и чувствительностью процесса транскрипции хорошо согласуется с постулируемым механизмом действия рентгеновского облучения. Более того, недавно на клетках культуры дрозофилы была установлена разная чувствительность к рентгеновскому облучению для разных генов, коррелирующая не с размерами самих генов, а с размерами доменов, в состав которых входят эти гены.

Одноцепочечные разрывы, вызванные облучением, репарируются, причем скорость репарации в клетках разных типов различна. В описываемых опытах была обнаружена взаимосвязь между ходом репарации одноцепочечных разрывов и восстановлением транскрипции, что служит дополнительным подтверждением зависимости последней от топологии ДНК в составе петли.

Наконец, было изучено влияние рентгеновского облучения на синтез РНК в бактериальных клетках. При тех же дозах облучения в них накапливалось такое же число одноцепочечных разрывов, но это никак не сказывалось на уровне транскрипции. Известно, что у бактерий, где нет гистонов, вся ДНК в клетке находится в суперспирализованном состоянии. При этом релаксация активирует примерно 15 % генов и ингибирует другие 15 % генов. Остальные гены не чувствительны к релаксации. Поэтому неудивительно, что релаксация ДНК практически не сказыв-

Таблица 6

Обратная корреляция между дозой облучения, необходимой для блока транскрипции, и предположительными размерами петли (по результатам, полученным А. Н. Лучником и соавт.)

Организм, клетка, ген	Средний размер реплика, петли (или повторяющейся единицы), т. п. н.	Доза, нужная для подавления транскрипции на 63 %, крад
Курица (<i>Gallus domesticus</i>), клетки крови	200	5
Обезьяна, клетки CV-1	130	10
Дрожжи (<i>S. cerevisiae</i>)	60	100
Дрозофила (<i>D. melanogaster</i>), клетки Шнайдера	40	200
Ген белка теплового шока, р85	—	150
Гены рРНК	(11,5)	200
Гены 5S РНК	—	230
Гены гистонов	(4,8)	450

вается на общем уровне транскрипции в клетках бактерий. Опыты на бактериях служат дополнительным контролем, ибо они указывают на нечувствительность транскрипции, как таковой, к рентгеновскому облучению.

Резюмируя полученные результаты, можно с большой долей вероятности предположить, что релаксация ДНК в транскрипционно активном хроматине сразу останавливает процесс транскрипции, причем РНК-полимеразы, уже начавшие транскрипцию, тем не менее останавливаются. Очевидно, это связано с перестройками хроматиновой матрицы при снятии торзионных напряжений.

4.6. О механизме действия энхансеров и сайленсеров

Литература: [198—203]

Приведенная в настоящей главе информация позволяет высказать предположение о механизме работы энхансеров и сайленсеров, хотя до решения этого вопроса еще далеко. Любые гипотезы должны учитывать, естественно, тот твердо установленный факт, что действие энхансеров и сайленсеров реализуется через их взаимодействие со специфическими регуляторными белками.

Одной из первых гипотез было предположение, что энхансеры (для краткости не буду упоминать сайленсеры, но механизм действия для них, очевидно, сходен) являются местами вхождения РНК-полимеразы или факторов транскрипции, которые затем мигрируют по ДНК и находят промотор. Это предположение подкреплялось тем, что если между энхансером и промотором (ТАТА-блок) вставлен дополнительный ТАТА-блок, транскрипция начинает идти с нового ТАТА-блока, а старый выключается. Однако это оказалось далеко не общим правилом. Гипотеза «входных ворот» плохо объясняет действие энхансеров, расположенных внутри гена или за геном.

Другая гипотеза выдвигает на первый план взаимодействие энхансеров с ядерным скелетом, в результате чего может проходить его пространственное сближение с другими контрольными элементами гена. В пользу этого говорят упомянутые выше данные (см. разд. 3.4) о взаимодействии энхансеров с ядерным скелетом через топо II. Однако нативность этих взаимодействий пока не доказана. Кроме того, против этой гипотезы говорят данные Дж. Ванга (США), согласно которым наличие сшивок цепей ДНК по обеим сторонам энхансера подавляет его действие.

Иными словами, последовательности, лежащие между энхансером и геном, участвуют в проведении сигнала от энхансера.

Третья гипотеза основана на предположении о взаимодействии белка, связанного с энхансером, с белками других энхансеров и промоторной области за счет контактов между участками одного топологического домена. Эта гипотеза «выпетливания» (looping out) базируется на ряде экспериментальных фактов, полученных на генах дрожжей, где регуляторные белки связываются с участками, расположеннымися перед генами. Они напоминают по некоторым свойствам энхансеры, но не идентичны им. В частности, они не активны при помещении после гена.

Наиболее элегантны опыты с химерными регуляторными белками, где в исследуемый ген вставляли бактериальный оператор, а ген-регулятор модифицировали таким образом, что ответственный за связывание с ДНК участок кодировался бактериальным геном-регулятором. Продукт такого гена — химерный белок-регулятор связывался с встроенным бактериальным оператором и тем не менее активно стимулировал работу дрожжевого гена. Иными словами, последовательность ДНК, с которой связывался белок-регулятор, не играла роли для его действия. Однако упомянутые выше опыты Ванга противоречат и этой гипотезе. Тем не менее сейчас это наиболее вероятная гипотеза, получающая все новые подтверждения.

Четвертая обсуждаемая возможность связана с наличием торзионных напряжений в активном хроматине. Можно предположить, что торзионные напряжения создают условия для контролируемых энхансерами конформационных переходов в ДНК. Исследования последних лет показали высокое конформационное разнообразие и конформационную подвижность ДНК (см. разд. 4.5). Само по себе появление торзионного напряжения может переводить ДНК гена на всем его протяжении или на отдельных участках в конформацию, благоприятную для транскрипции, например конформацию ДНК, близкую к А-форме, у которой шаг спирали состоит не из ~ 10 , а из ~ 11 п. н. Анализ поведения ДНК в растворе при

электрофорезе суперспирализованной ДНК указывает на возможность такого перехода уже при низких значениях суперспиральной плотности. В то же время на бесклеточных системах получены данные, согласно которым суперспирализованная ДНК транскрибируется РНК-полимеразой II дрожжей более эффективно, чем релаксированная. Существенно также, что в напряженной ДНК возникают условия для передачи сигнала на значительные расстояния. Если связывание регуляторных белков с энхансером вызывает конформационные изменения энхансера, то эти изменения могут передаваться по длине ДНК, находящейся в состоянии эластического напряжения. Например, переход $Z \rightarrow B$ в одном месте может вызывать переход $B \rightarrow Z$ или $B \rightarrow A$ в другом месте топологически замкнутой ДНК.

В связи с обсуждаемыми возможностями представляется интересным, что общий уровень суперспирализации ДНК в петлях хромосом снижается по мере дифференцировки и старения клеток и возрастает при их дифференцировке и опухолевом превращении.

Обсуждаемая гипотеза, однако, также не объясняет вышеприведенных данных Ванга.

Наконец, в-пятых, можно предположить, что энхансеры служат местами, с которых после взаимодействия с белками-регуляторами вдоль хромосомной фибриллы идет кооперативный конформационный переход, заключающийся, например, в дестабилизации нуклеосом, их обратном разворачивании и возникновении торзионных напряжений. Этот переход может создавать необходимые предпосылки для транскрипции. Данная гипотеза не имеет пока экспериментальных подтверждений, но отсутствуют и противоречащие ей данные.

Можно думать, что реализуется не один, а несколько из упомянутых выше механизмов. Или, что весьма вероятно, истинный механизм работы энхансеров далек от того, что выдвинула к настоящему моменту фантазия исследователей.

4.7. Резюме

В отличие от предыдущих глав эта глава не содержит однозначных и четких выводов. Можно говорить о ряде признаков транскрипционно активного хроматина, но нельзя создать стройную схему его работы и регуляции его активности.

Ясно, что активный хроматин имеет более открытую конфигурацию и что в нем разрушен соленоидный уровень упаковки. Это, по всей вероятности, связано с удалением (или модификацией) гистона H1. Однако механизм этого удаления и факторы, определяющие его специфику, абсолютно не ясны.

Очевидно, что имеется много регуляторных белков, взаимодействующих с разными контрольными элементами генов, в том числе энхансерами, сайленсерами и промоторами. Возможно, они взаимодействуют и между собою. Однако остается во многом не ясно, каким образом они усиливают или ослабляют работу гена.

Наконец, общая организация активного хроматина изменена таким образом, что в нем появляются эластичские торзионные напряжения, но механизм их появления не ясен. По-видимому, они или структурные изменения хроматина, их порождающие, являются необходимыми факторами транскрипции, но опять-таки механизмы этой зависимости не известны.

Таким образом, мы находимся в настоящее время на поверхности и видим лишь внешние проявления, не понимая их сути. Однако быстрое развитие новых методических подходов позволяет рассчитывать на решение проблемы активного хроматина в недалеком будущем. Важность же решения этой проблемы для молекулярной биологии эукариотического гена трудно переоценить.

Глава пятая

РАБОТА ГЕНА И ЕГО РЕГУЛЯЦИЯ НА УРОВНЕ ЯДЕРНОЙ РНК: ЯДЕРНЫЕ РИБОНУКЛЕОПРОТЕИДНЫЕ (РНП) ЧАСТИЦЫ — СУБСТРАТ ПРОЦЕССИНГА

5.1.^{1*} Открытие ядерных РНП-частиц, содержащих про-мРНК (гяРНК)

Литература: [204, 205]

После того как в 1962 г. мы с В. Л. Мانتьевой открыли ядерную ДНК-подобную РНК (дРНК) и затем с О. П. Самариной получили данные, что она является высокомолекулярным предшественником мРНК цитоплазмы (про-мРНК), возник вопрос о том, в каком виде она существует в клеточном ядре. Это было тем более важным, что местом процессинга про-мРНК является клеточное ядро, и там с РНК должны происходить многочисленные превращения, в том числе и открытый много позднее сплайсинг.

Именно поэтому с конца 1963 г. О. П. Самарина в нашей только что созданной лаборатории Института молекулярной биологии АН СССР развернула исследования по выяснению вопроса, в какой форме дРНК, или гяРНК (гетерогенная ядерная РНК), присутствует в ядре. О. П. Самарина имела шансы на успех, поскольку еще в нашей совместной работе 1960 г. из ядер с помощью экстракции разбавленными солевыми растворами с последующим дифференциальным ультрацентрифугированием были извлечены частицы, активно включавшие *in vivo* метку в РНК. Эти частицы содержали РНК, по нуклеотидному составу промежуточную между рРНК и ДНК, т. е. они явно содержали и гяРНК.

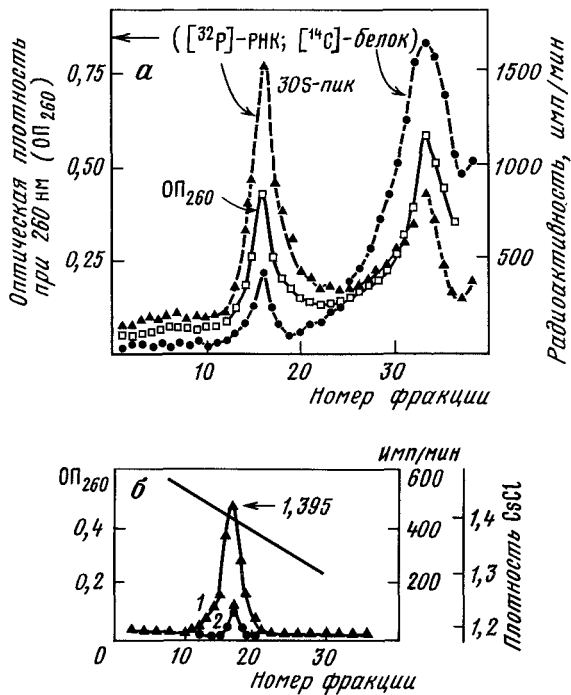
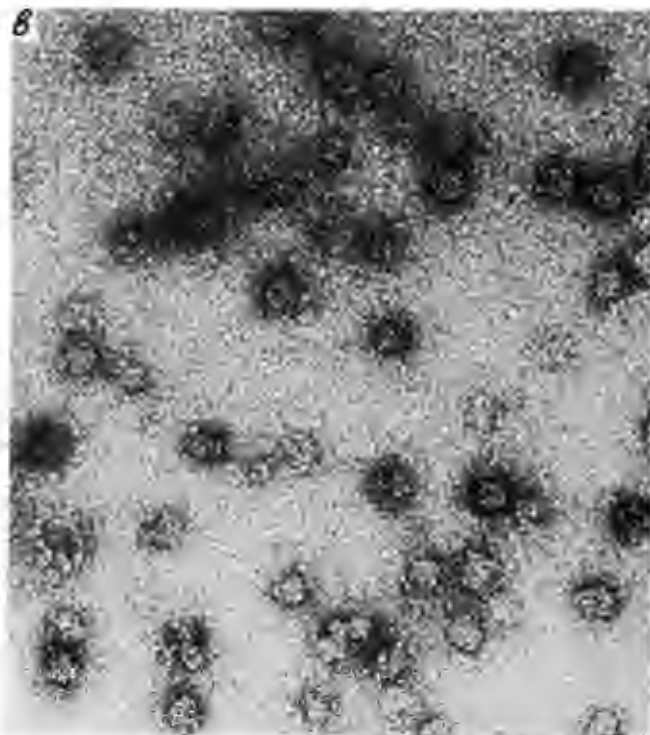


Рис 35. 30S-частицы, содержащие ядерную дРНК (гяРНК)

а выделение 30S частиц из ядер клеток печени крысы. Клетки метили *in vivo* [^{14}C]-аминокислотами (в течение длительного времени) и [^{32}P]-ортофосфатом. Ядерный экстракт (рН 7.8) ультрацентрифугировали в сахарозном градиенте. В центре пробирки виден гомогенный 30S пик оптической плотности при 260 нм (ОП₂₆₀), содержащий основную массу меченой РНК и некоторое количество меченого белка;

б ультрацентрифугирование 30S-частиц, фиксированных формальдегидом, в градиенте плотности CsCl. Они собираются в один гомогенный пик с плавучей плотностью $\sim 1.4 \text{ г см}^3$. 1 — [^{32}P], 2 — [^{14}C], в — электронная микроскопия 30S-частиц (негативное контрастирование). Видны гомогенные частицы с диаметром около 200 Å (по результатам, полученным О. П. Самариной и соавт.)



Было испробовано несколько схем фракционирования для очистки частиц, содержащих гЯРНК, и в результате разработан очень простой метод для их выделения.

Ядра, приготовленные из печени крысы (метка — [^3H]-уридин или [^{32}P]-ортофосфат), экстрагировали большим объемом буфера (HMT), содержащего 0,1 М NaCl, 1 мМ MgCl_2 и 10 мМ трис-HCl, pH 6,8—7,0. При этом экстрагировались растворимые белки и РНК с нуклеотидным составом, близким к рРНК. Этот экстракт отбрасывали. Затем проводили трехкратную экстракцию

тем же НМТ-раствором, но при pH 7,8. Во всех трех экстрактах выявлялась РНК, но нуклеотидному составу похожая на ДНК.

Экстракты смешивали, наслаивали на 15—30 %-ный сахарозный градиент в буфере НМТ и ультрацентрифугировали ночь при 20—25 000 об/мин. После раскапывания определяли РНК по радиоактивной метке.

Было обнаружено два компонента: низкомолекулярный (4—6S) компонент и высокомолекулярный, весьма однородный 30S-пик (рис. 35). Последний выявлялся не только по радиоактивности. Такой же дискретный однородный пик был виден и при определении УФ поглощения. Это открывало пути к выделению 30S-частиц в препаративных количествах с высокой степенью чистоты. Далее была проведена первичная характеристика 30S-частиц. Они содержали около 20 % РНК и 80 % белка, и их РНК по своему нуклеотидному составу точно соответствовала ДНК, т. е. это была чистая про-мРНК (или гяРНК). Первое сообщение о 30S-частицах, содержащих гяРНК, появилось в 1965 г.

Однако в 1964 г. из лаборатории А. С. Спирина вышла работа, в которой было описано открытие информсом, цитоплазматических частиц, содержащих мРНК, выделенных из развивающихся эмбрионов морского ежа. Эти частицы содержали мРНК и белок. Для их характеристики применен метод ультрацентрифугирования в градиенте хлористого цезия после фиксации формальдегидом. Фиксация препятствовала диссоциации РНП в растворе с высокой ионной силой. Оказалось, что частицы имели плавучую плотность $1,4 \text{ г/см}^3$ или несколько выше, что соответствовало соотношению РНК : белок $\sim 1 : 4$. Это исключало возможность присутствия в них рибосом (плотность 1,5—1,56). А. С. Спириным была развита концепция, что информсомы — это форма существования мРНК в цитоплазме, инертная в отношении трансляции, где белки выступают в роли регуляторов трансляции.

Различие в свойствах между информсомами и ядерными частицами состояло в том, что первые были гетеро-

генны, а вторые — исключительно гомогенны. Естественно, они отличались и по своей локализации в клетке (цитоплазма — ядро). Возникла длительная дискуссия, являются ли те и другие частицами одной природы или это разные клеточные структуры. Через много лет оказалась верной вторая точка зрения. Ядерные рибонуклеопротеиды, содержащие про-мРНК (гяРНК), сокращенно про-мРНП (или гяРНП), и информосомы — это два разных класса клеточных частиц, различающиеся по своей организации, белковому составу и функциям. В нашем изложении речь пойдет исключительно о ядерных РНП.

5.2^{1*}. Структурная организация 30S-частиц

Литература: [206—210]

Следующий этап исследований группы О. П. Самариной (1965—1967 гг.) включал детальную характеристику 30S-частиц. Было показано, что при ультрацентрифугировании фиксированных 30S частиц в градиенте плотности CsCl (по А. С. Спирину) они взвешиваются в виде чрезвычайно гомогенного пика с плотностью $1,4 \text{ г/см}^3$, что соответствовало прямо определенному в них соотношению белок : РНК.

РНК 30S-частиц оказалась весьма чувствительной к РНКазе. Она легко гидролизовалась почти полностью, причем практически с той же скоростью, что и свободная РНК. Иными словами, белок 30S-частиц очень слабо защищал РНК от РНКазы. Отсюда можно было предположить, что РНК располагается не внутри частиц, как в рибосоме (там она в значительной мере защищена от РНКазы), но на их поверхности. Далее оказалось, что 30S-частицы могут связывать дополнительную РНК, если проинкубировать их со свободной гяРНК. Кинетика гидролиза этой дополнительно связанной РНК и собственной РНК частиц РНКазой не отличалась. Это наблюдение служило дополни-

тельным аргументом в пользу локализации РНК на поверхности 30S-частиц.

30S-частицы легко разрушались при повышении концентрации NaCl до 1—2 М, но при последующем диализе к исходному раствору происходила их реконструкция. При электронной микроскопии частицы выглядели как относительно гомогенные компактные образования с диаметром около 20 нм. Наконец, были определены размеры РНК 30S-частиц, и оказалось, что они невелики. Выделенная из частиц РНК седиментировала с константой седиментации 4—6 S, что соответствует РНК длиной в 100—200 нуклеотидов.

Возникло явное противоречие. С одной стороны, в состав 30S-частиц входила почти вся гяРНК ядра. С другой стороны, размеры гяРНК варьируют от 1000 до десятков тысяч нуклеотидов, т. е. во много раз превышают размеры РНК 30S-частиц. Мы предположили, что 30S-частицы — это мономеры, образующиеся из более сложных структурных образований, и стали искать возможности проверки этой гипотезы.

5.3 ^{1*}. Расшифровка структуры нативных гяРНК

Литература: [211, 212]

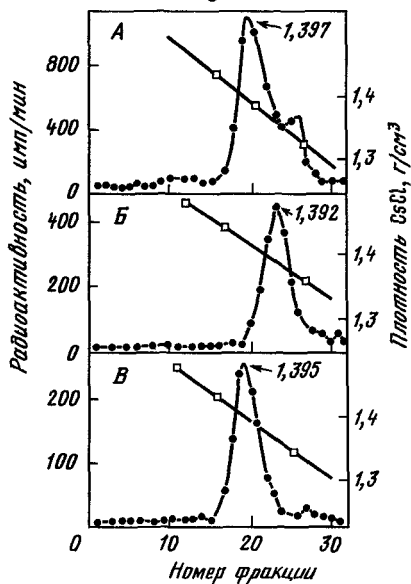
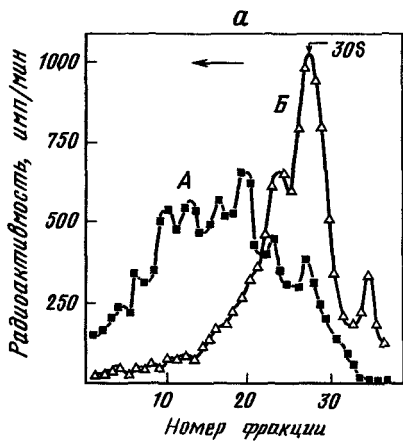
Весной 1967 г. я обратил внимание на статью Г. Лоуфорда и соавт. (Канада), в которой сообщалось о выделении полисом из клеточных ядер с помощью экстракции в присутствии ингибитора РНКазы из цитоплазмы печени крысы. Анализ рисунков статьи вызвал у меня подозрение, что полученные автором «полисомы» вряд ли являются на самом деле полисомами, а, возможно, соответствуют искомым нами частицам. Наиболее же важным для нас было сообщение об использовании ингибитора РНКазы.

О. П. Самарина и ее аспирант Е. М. Луканидин в несколько дней получили цитоплазматический ингибитор нуклеазы и провели выделение ядерных частиц обычным

нашим методом, но с добавкой ингибитора ко всем экстрагирующим растворам. Результаты превзошли все ожидания. В сахарозном градиенте вместо одного пика 30S-частиц появилась серия дискретных пиков с коэффициентами седиментации 30S, 47S, 56S, 60S и т. д., вплоть до 100—200 S, которые содержали новообразованную РНК (рис. 36). Эта РНК по нуклеотидному составу соответствовала ДНК. Наиболее существенным явилось наблюдение, что если обработать тяжелые частицы строго подобранной дозой РНКазы, то меченая РНК количественно переходит в 30S-частицы. Следовательно, тяжелые РНП состоят из серии мономеров, 30S-частиц, соединенных цепью РНК точно в соответствии с исходным предположением.

Более детальный анализ показал структурную однородность тяжелых частиц. Ультрацентрифугирование фиксированного материала в градиенте плотности хлористого цезия показало, что частицы любого размера имеют одну и ту же плавучую плотность ($1,41 \text{ г/см}^3$), т. е. отношение РНК/белок в них одинаково. При электронной микроскопии в 30S-пике были видны отдельные компактные частицы, в 47S-пике — димеры, в 70—75S-зоне — тетра- и пентамеры и в 90—100S-зоне — октамеры. Таким образом, дискретность пиков обусловлена тем, что в каждом содержится целое число 30S-частиц. Размеры РНК возрастают пропорционально размерам частиц. В 30S-частицах присутствовала 8,5S-РНК, в димерах — 14S, тримерах — 16,8S, пентамерах — 21S-РНК и в 120—130S-частицах — гетерогенная РНК с пиком в области 32S. Расчеты показывают, что на мономер в каждом случае приходился отрезок РНК длиной около 600 нуклеотидов.

Наконец, был изучен белковый состав частиц. Эти опыты вначале велись работавшим в нашей лаборатории научным сотрудником из Венгрии Я. Молнером. В первых экспериментах была использована система электрофореза в полиакриламидном геле в ацетатном буфере pH 4,5, содержащем мочевины. При этом происходило разделение



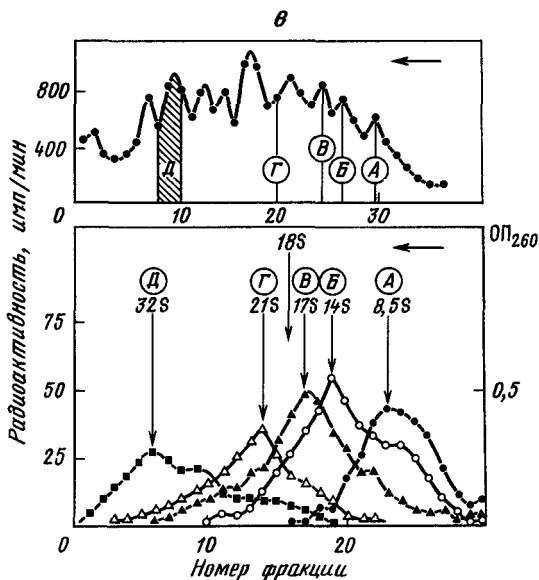


Рис. 36. Выделение нативных ядерных РНП-частиц.

а — ультрацентрифугирование в сахарозном градиенте ядерного экстракта из клеток печени крысы, полученного в присутствии ингибитора РНКазы (А). На седиментограмме — серия дискретных пиков, от 30S до 150S. После мягкой обработки РНКазой (Б) почти вся меченая РНК (клетки метили в течение 30 мин [^{14}C]-оротовой кислотой) перемещается в 30S-пик; *б* — ультрацентрифугирование частиц из разных областей сахарозного градиента в градиенте плотности CsCl (после фиксации формальдегидом; А — 30S-частицы, Б — 60S-частицы, В — 100S-частицы; *в* — размеры РНК из разных фракций ядерных РНП-частиц. Наверху — седиментограмма ядерных РНП, полученных в присутствии ингибитора РНКазы. Из отдельных пиков (указанных буквами) выделяли РНК и рецентрифугировали ее в сахарозном градиенте (более длительное время). Цифры указывают коэффициенты седиментации этих РНК (для максимумов). 28S и 18S — маркеры рРНК; γ — электронная микроскопия ядерных РНП из разных зон сахарозного градиента (метод напыления), А — 30S частицы, Б — 45S-зона (димеры), В — 70–75S-зона (тетра- и пентамеры), Г — 90–100S-зона (по результатам, полученным О. П. Самариной, Е. М. Луканидиным и др.)

2

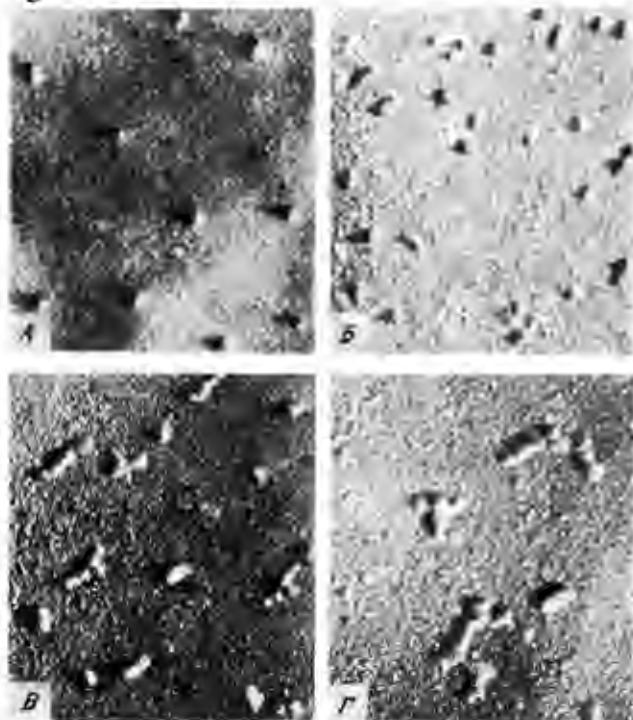


Рис. 36 (окончание)

белков и по заряду, и по молекулярной массе, но одновременно могла происходить и потеря некоторых белков. В 30S-частицах были выявлены три главные полосы. Совершенно аналогичные полосы выявлялись и в более тяжелых частицах. Таким образом, и по белковому составу поличастицы и моночастицы совпадали.

Учитывая полученные результаты, а также наши ранние

данные, свидетельствовавшие о локализации РНК на поверхности частиц, мы предложили модель организации ядерных гЯРНП, согласно которой высокомолекулярная РНК в ядрах наматывается на глобулярные белковые частицы, названные информоперами, т. е. носителями информационной РНК. На каждый информопер навивается отрезок РНК длиной ~ 600 нуклеотидов. Комплекс информопера и такой РНК образует мономер или 30S-частицу. Для обозначения 30S-частиц недавно предложен термин рибонуклеосома. Отдельные 30S-частицы соединены между собою короткими мостиками РНК, разрывы которых при РНК-азной обработке ведут к переходу поличастиц в 30S-частицы. Эта модель прямо вытекает из данных, приведенных выше, и доказывается ими. Единственным недостаточно доказанным положением являлось положение о наматывании РНК на поверхность информопера, ибо оно базировалось в основном на результатах РНКазного переваривания. Поэтому в последующей работе мы обратили особое внимание на проверку именно этого предположения.

Следует отметить, что описанная для ядерных РНП частиц структурная организация явилась совершенно новым типом организации нуклеопротеида, когда нуклеиновая кислота наматывается на серию компактных белковых глобул, образуя цепочку бусин на нити. Позднее точно такой же принцип организации был описан, как известно, для хроматиновых фибрилл, нуклеосом (см. гл. 3), т. е. он является общим для главных полимеров клеточного ядра, ДНП и РНП. Однако лишь после открытия этого типа организации для нуклеосом он получил общее признание.

Вообще наши работы по РНП-частицам долгое время не находили широкого отклика. Часть западных авторов считали РНП-частицы артефактом. Другие опубликовали статьи, в которых пытались опровергнуть наши данные. Обычно опровержения базировались на неточном воспроизведении эксперимента на его решающих этапах. Лишь

к середине 70-х годов наши работы стали получать многочисленные подтверждения, и в настоящее время описанная здесь структура РНП-частиц является общепризнанной.

Следующим этапом наших исследований (конец 60-х – начало 70-х годов) явилось уточнение структуры мономера, 30S-частиц, а также изучение их белкового состава.

5.4 ^{1*}. Информатины

Литература: [213—222]

Очевидно, что информофер имеет очень большую молекулярную массу. Исходя из его диаметра, она должна быть равна по крайней мере $(1-2) \cdot 10^6$. Следовательно, он должен был, вероятно, состоять из большого числа полипептидных цепей. После первой работы Я. Молнара опыты по белковому составу ядерных РНП вела в нашей лаборатории А. А. Кричевская. Обработывая препараты белка меркаптоэтанолом для разрушения S—S-связей, она получила вместо нескольких основных полос одну главную полосу. При проведении электрофореза в додецилсульфате натрия было показано, что молекулярная масса этого компонента равна примерно 40 000. Позднее Т. Мартин (США) и Е. М. Луканидин в нашей лаборатории показали, что эта полоса разделяется на два главных компонента с близкими молекулярными массами. Мы назвали этот основной белок РНП частиц **информатином**. Каждый информофер, таким образом, состоит из нескольких десятков молекул информатина (по современным оценкам, ~36) (рис. 37).

Дальнейшие исследования информатина велись уже в других лабораториях, причем для его обозначения обычно стал использоваться термин «сердцевинные белки» («core proteins»). При высокоразрешающем электрофорезе их можно разделить на 6 фракций: A1, A2,

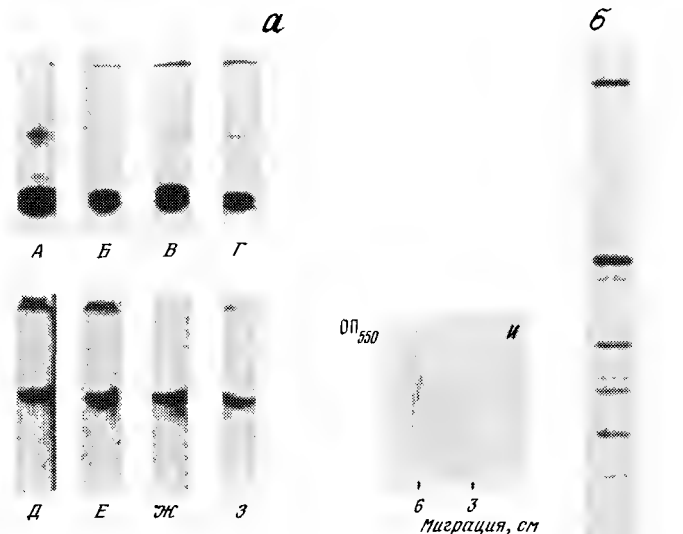


Рис. 37. Главный белковый компонент 30S-РНП-частиц (рибонуклеосом) информатин

а электрофорез белков очищенных 30S-частиц в полиакриламидном геле, А Г разделение вели в присутствии додецилсульфата; Д З – разделение в ацетатном буфере pH 4,5, содержащем мочевины; А, Д исходные 30S-частицы, Б, Е материал 30S-частиц после очистки повторным ультрацентрифугированием, В, Ж белки из 4S-зоны сахарозного градиента в 2 М NaCl (см ниже, рис 38), Г, З – чистые информеры, полученные диссоциацией 30S-частиц из Б, Е (см ниже, рис. 38), И сканирование геля (Г) Видно, что в присутствии додецилсульфата выявляются два главных компонента информатина с молекулярной массой около 40 000, а в ацетатном буфере pH 4,5, содержащем мочевины, они комигрируют (по результатам, полученным Е. М. Луканиным и А. А. Кричевской) б – высокоразрешающий электрофорез белков 30S-частиц. Видно 6 главных компонентов в зоне 40S (по результатам, полученным Х. Бейером и соавт.)

44 — C2
42 — C1
36 — B2
34 — B1
32 — A2
A1
М.М
кДа

В1, В2 (очень близкие друг другу полипептиды), С1 и С2 (тоже очень близкие между собой полипептиды, см. рис. 37). Часть различий между ними может зависеть

от модификаций. Например, у низших эукариот найден лишь один тип информатина. Клонирование генов информатинов, которое осуществлено в ряде лабораторий, показывает, что эти белки кодируются у млекопитающих семейством эволюционно консервативных генов. Весьма вероятно, что это семейство возникло путем дупликации единственного информатинового гена, имеющегося у низших организмов.

Опыты по клонированию генов информатинов подвели черту под длинной дискуссией о гомогенности или гетерогенности ядерных РНП-частиц. Долгое время часть авторов [например, М. Жакоб (Франция) и др.] активно поддерживали точку зрения о чрезвычайно сложном белковом составе гЯРНП и о гетерогенности последних. Их результаты, однако, объяснялись использованием процедуры, при которой гЯРНП выделялись вместе с обломками ядерного матрикса. В настоящее время общепризнано, что набор структурных белков ядерных РНП простой и состоит из семейства родственных полипептидов.

Опыты по клонированию позволили определить нуклеотидную последовательность генов и тем самым аминокислотную последовательность белков. Наиболее интересной особенностью структуры изученных информатинов является их доменная организация. Два похожих домена, расположенных на N-конце, содержат участки связывания РНК, напоминающие участки связывания РНК в других белках. С-конец обогащен глицином, имеет малоупорядоченную структуру и обнаруживает гомологию с кератином. Вероятно, С-домен отвечает за белок-белковые взаимодействия между молекулами информатина в рибонуклеосоме.

Интересно, что продукты частичного протеолиза информатина были выделены из эукариотических клеток в форме белков, связывающихся с одноцепочечной РНК и ДНК. Они способны плавить вторичные структуры в РНК.

Теми же свойствами обладают и нативные информатины. О значении этого их свойства речь пойдет ниже.

Помимо информатинов, РНП-частицы содержат и другие, минорные, компоненты (подобно тому как хроматин, кроме гистонов, содержит различные негистоновые белки). Эти компоненты, вероятно, являются ферментами и различными регуляторными белками, взаимодействующими с РНК. Однако доминирующий структурный компонент гяРНП — это информатины.

5.5 ^{1*}. Информоферы

Литература: [223—230]

Каким образом молекулы информатина формируют информофер и 30S-частицу? Этот вопрос детально исследовался Е. М. Луканидиным и В. В. Кульгускиным в экспериментах по диссоциации и реконструкции 30S-частиц.

Ранее указывалось, что при переваривании 30S-частиц РНКазой разрушается практически вся входящая в их состав РНК. К сожалению, белки частиц при этом агрегируют и выпадают в осадок (опять же сходным образом ведет себя и ДНП хроматина). Поэтому для изучения организации 30S-частиц этот подход непригоден. Однако, если обработать 30S-частицы растворами NaCl высокой концентрации (~ 2 М), то белок и РНК диссоциируют, и белок при этом остается в растворе. Чтобы следить за белком, его предварительно метили [¹²⁵I], проводя его йодирование в составе 30S-частиц. После диссоциации 30S-частиц в 2 М NaCl неожиданно оказалось, что меченый белок седиментирует в сахарозном градиенте примерно с той же скоростью, что и исходные частицы ($\sim 30S$). Это означало, что, хотя РНК и удалена, частицы по-прежнему сохраняют свою форму и размеры, т. е. информоферы не диссоциируют на цепи информатина (рис. 38). Действительно, при электронной микроскопии свободные информоферы выглядят практически так же, как и 30S-РНП. Однако при

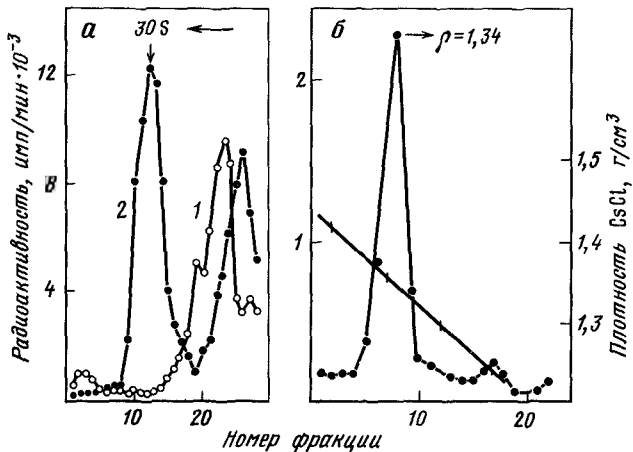
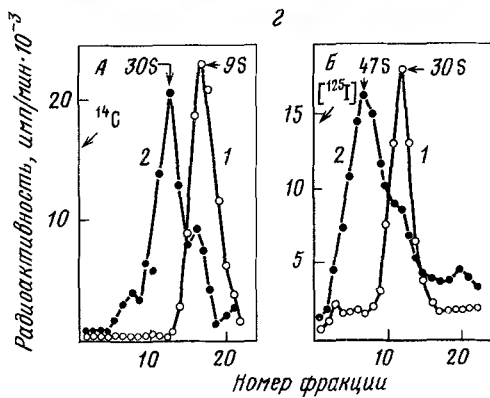
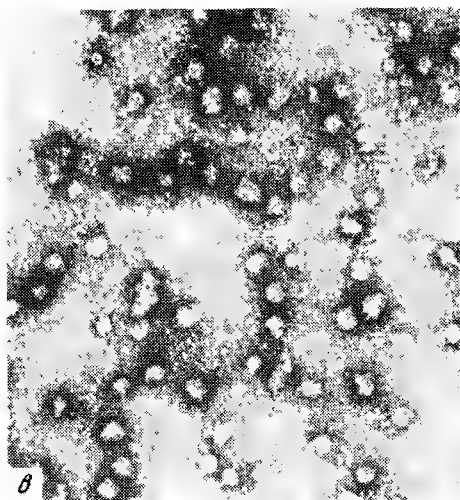


Рис. 38. Выделение свободных информоферов и реконструкция рибонуклеосом

а — диссоциация 30S-частиц на РНК и информоферы 30S-частицы, меченные [¹⁴C] по РНК, йодировали [¹²⁵I] (белковая метка), диализовали против 2M NaCl и ультрацентрифугировали через 15–30 %-ный сахарозный градиент в 2 M NaCl. 1 — меченая РНК; 2 — меченый белок; значительная часть последнего образует 30S-частицы, лишенные РНК, или информоферы. *б* — ультрацентрифугирование информоферов в градиенте плотности CsCl (с фиксацией или без фиксации формальдегидом). Плавающая плотность падает до 1,34 г/см³ вместо 1,4 г/см³ у 30S-частиц; *в* — электронная микроскопия свободных информоферов (негативное контрастирование). По размерам (диаметр ~200 Å) и внешнему виду свободные от РНК информоферы очень похожи на рибонуклеосомы; *г* — реконструкция рибонуклеосом из РНК и свободных информоферов. *А* — ультрацентрифугирование в сахарозном градиенте свободной меченой гЯРНК (1), использованной для реконструкции, и полученных из этой РНК и информоферов 30S-частиц (2). Реконструкцию вели диализом смеси от 2 M NaCl к 0,1 M NaCl, 1 mM MgCl₂, 0,025 M фосфату, pH 7,5. Реконструированные частицы неотличимы от исходных по плавающей плотности (1,4 г/см³ и электронно-микроскопической картине). *Б* — для реконструкции использовали меченные [¹²⁵I] информоферы и немеченую гЯРНК размером 6 10S (1) или 12 18S (2). В первом случае образуются мономеры, во втором — димеры рибонуклеосом; *д* — схема опыта по реконструкции и повторной диссоциации рибонуклеосом из нейодированных белков и РНК. В 2 M NaCl белки нейодированных рибонуклеосом находятся в зависящем от концентрации равновесии между информоферами и одиночными цепями информатина. Только реконструкция с информоферами дает «правильные» рибонуклеосомы, способные к последующей диссоциации на РНК и белок (по результатам, полученным Е. М. Луканидиным и соавт.)



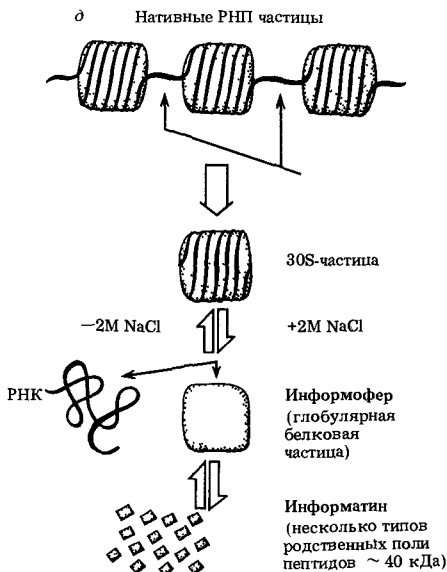


Рис 38 (окончание)

ультрацентрифугировании в CsCl (в данном случае несущественно, с формальдегидной фиксацией или без нее), частицы взвешивались при плотности $1,34 \text{ г/см}^3$, т.е. действительно РНК из них была удалена. Ни после короткой, ни после длительной метки не удалось выявить какой-либо РНК в составе чистых информоферов.

Еще одним важным свойством информоферов явилась их способность к легкой ассоциации со своей или с экзогенной гЯРНК при диализе от 2 M NaCl к исходному буферу НМТ. При этом в зависимости от размеров добавленной РНК происходило образование либо 30S-частиц, либо их олигомеров, т.е. удавалось воссоздать не только 30S-частицы, но и структуры, близкие к нативным гЯРНП.

(бусы на нити). Таким образом, концепция информофера и одновременно локализация РНК на поверхности информофера получили полное подтверждение. Здесь, однако, возник ряд осложнений, потребовавших дальнейшей работы.

Оказалось, что если использовать не мечение [^{125}I] *in vitro*, а включение меченых аминокислот *in vivo*, то после диссоциации в 2 М NaCl информоферы распадаются на молекулы информатинов. Можно было предположить, что химические реакции, идущие при йодировании, каким-то образом стабилизируют информофер, например, за счет образования S-S-связей между разными цепями информатинов. Для дальнейшего исследования вопроса 30S-частицы были получены в высокой концентрации и после диссоциации в 2 М NaCl исследованы с помощью аналитического ультрацентрифугирования. При этом было обнаружено, что в растворе 2 М NaCl существует обратимое равновесие информофер $\rightleftharpoons$ информатины, причем, естественно, чем выше концентрация белка, тем выше содержание информоферов. Взаимодействие молекул информатинов между собою строго кооперативно, так как никаких других компонентов, кроме информатинов и дискретного пика информоферов, не выявляется. Итак, между информоферами и информатинами в 2 М NaCl существует обратимое равновесие. При этом йодирование информоферов блокирует их диссоциацию.

Если вести реконструкцию 30S-частиц с РНК при высокой концентрации белка, т. е. когда в растворе преобладают информоферы, то образуются 30S-частицы, по свойствам идентичные исходным. Они способны снова диссоциировать в 2 М NaCl и полностью чувствительны к РНКазе. Однако реконструкция, выполненная при низкой концентрации белка (в растворе — свободный информатин), хотя и ведет к формированию 30S-частиц, но эти частицы отличаются от нативных устойчивостью к РНКазе и 2 М NaCl. Иными словами, молекулы информатина

обладают сродством к РНК и взаимодействуют с ней, но укладка их в глобулу не носит упорядоченного характера, и РНК более не располагается на поверхности частицы.

Выводы исследований Е. М. Луканидина были далее проверены в группе О. П. Самариной. Молекулы информатина в составе 30S-частиц специально сшивали между собой с помощью обычно используемых для белок-белковых сшивок химических реагентов и тем самым полностью исключали возможность их диссоциации на каком-либо этапе выделения свободных информоферов. Несмотря на это, РНК легко удалялась из 30S-частиц и далее легко проходила реконструкция 30S-частиц или олигочастиц из гяРНК и свободных зашитых информоферов. Эти опыты исключают какой-либо иной тип укладки РНК в 30S-частице, кроме как наматывание на поверхность последней.

В то же самое время О. П. Самариной и сотрудницей физической лаборатории О. Ф. Борисовой велись исследования состояния РНК в 30S-частицах и в растворе с помощью оптических и флюоресцентных методов. Не входя в их детали, укажу на основной вывод из этой работы. Оказалось, что в РНК в составе 30S-частиц исчезает большая часть двухцепочечных участков, которые есть в свободной РНК, происходит плавление вторичной структуры РНК. Это не касается только длинных (100 – 200 нуклеотидов) двухцепочечных участков в РНК, которые вообще оказываются не связанными с информоферами. В связи с этим следует напомнить, что информатины являются предшественниками белков клетки, вызывающих плавление вторичных структур в нуклеиновых кислотах.

Таким образом, РНК не только наматывается на поверхность информофера, но при этом переходит на большей части своей длины в одноцепочечное состояние. Скорее всего, укладка РНК на поверхности информо-

фера должна носить упорядоченный характер (например, в форме спирали). Можно посчитать, что если длина 600-нуклеотидного отрезка РНК равна 300—400 нм, а диаметр информофера составляет ~ 20 нм, то на поверхности информофера уложится около шести витков РНК.

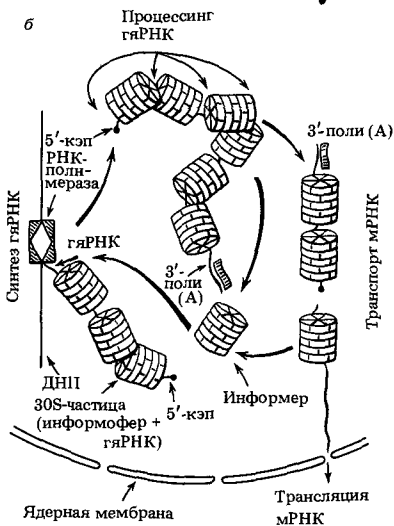
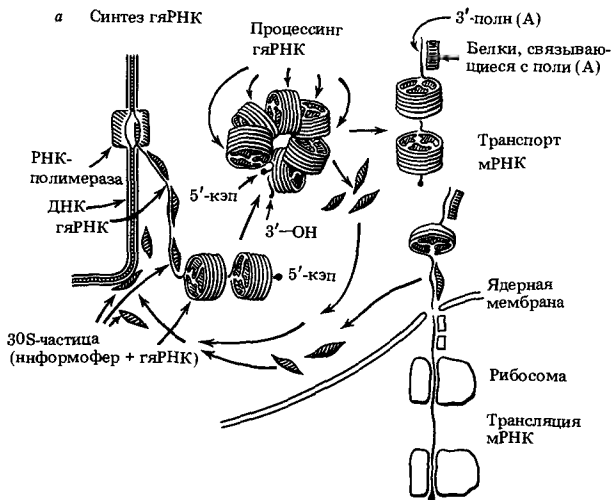
Что дает подобная организация РНП-частиц? Во-первых, резкую (15—20-кратную) редукцию линейных размеров, если исходить из длины вытянутой РНК. Во-вторых, доступность всей молекулы РНК действию ферментов процессинга и разным регуляторным факторам. Не исключено, что имеются и другие, более специфические функции, прямо вытекающие из организации 30S-частиц.

5.6^{1*}. Информоферный цикл

Литература: [231—238]

Один из вопросов, решавшихся в нашей лаборатории, заключался в том, какие классы ядерной РНК входят в состав комплексов с информоферами. Был получен ответ, что с ними связаны все классы гЯРНК, от новообразованной про-мРНК до зрелой мРНК. Ставились самые разнообразные опыты как на тотальных препаратах ядерной РНК после подавления синтеза рРНК малыми дозами актиномицина, так и на индивидуальных мРНК с использованием в качестве проб ДНК разных генов.

Наиболее интересный подход был разработан Е. М. Луканидиным. Им и Ф. Ноллем (ГДР) были впервые получены антитела к информатину, которые смешивали с раствором 30S-частиц и после фиксации вели ультрацентрифугирование в градиенте плотности CsCl. Если антитела связывались с частицами, плотность последних снижалась, и они собирались в пике с более низкой плотностью. Из тех частиц, которые смещались в градиенте (а сюда попадали практически все 30S-частицы), выделяли РНК и гибридизовали ее с разными пробами, включая



глобиновые гены и гены аденовируса. Во всех случаях соответствующие этим генам РНК выявлялись в комплексах с информоферами. О. П. Самарина с сотр. показала в сходных опытах, что РНК, синтезируемая в изолированных клеточных ядрах, тут же немедленно связывается с информоферами и включается в 30S-частицы.

Остается открытым вопрос о фазировании рибонуклеосом. Есть указания о специфическом расположении информоферов вдоль цепи гяРНК, но эти данные не являются пока однозначными и универсальными. Вероятнее всего, наряду с регулярной и однородной структурой комплекса в целом в нем может наблюдаться частичная гетерогенность, определяемая нуклеотидной последовательностью РНК или взаимодействием РНК с другими факторами, подобно тому как это имеет место в случае фазирования нуклеосом на ДНК.

Как бы то ни было, сразу после синтеза и на протяжении всей жизни в клеточном ядре гяРНК находится в комплексе с информоферами. Оставалось неясным, что происходит с нею при переносе в цитоплазму. Е. М. Луканидин в совместных работах с Р. Вильямсоном (Великобритания) и Ф. Ноллем (ГДР) показал, что белки, связанные с мРНК в полисомах, отличны от информатина, и информатин не выявляется в полисомах цитоплазмы. Позднее А. С. Спирин и сотр. получили очищенные препараты свободных информосом цитоплазмы и показали, что они также не содержат информатина. Согласно данным иммунофлюоресцентного анализа, информатин присутствует только в ядре. Итак, информоферы сопровождают мРНК только до ядерной мембраны. Там происходит

Рис. 39. Информоферный цикл

Два гипотетических варианта информоферного цикла, при которых освобождающиеся информоферы распадаются до молекул информатина (а) или остаются в виде высокомолекулярных агрегатов (б). Вся гяРНК связана с информоферами, кроме 3'-поли (А) (см. ниже рис. 40) (по результатам, полученным О. П. Самариной, Е. М. Луканидиным и автором)

«переодевание» мРНК, и уже в связи с другими белками, выполняющими иные функции, она поступает в цитоплазму.

На основе этих результатов мы предложили схему «информоферного цикла» (рис. 39). Согласно модели, на 1-м этапе информоферы связываются с новообразованной РНК по всей ее длине; на 2-м этапе на поверхности информоферов с гЯРНК происходят различные преобразования, составляющие процессинг и созревание мРНК. На 3-м этапе зрелая мРНК «переодевается» на ядерной мембране и транспортируется в цитоплазму, а информоферы, освободившиеся на 2-м и 3-м этапе, входят в новый цикл. Остается неясным, сохраняется ли целостность информофера между 3-м и 1-м этапами, или они распадаются на молекулы информатина.

5.7. Высшие уровни упаковки ядерных РНП-частиц и их взаимодействие с ядерным скелетом

Литература: [239]

В электронном микроскопе на срезах ядерные гЯРНП обычно выглядят как крупные глобулярные или неравномерные фибриллярные образования. Лишь в некоторых случаях в них удастся сразу выявить исходную РНП-фибриллу с 30S-частицами, сидящими на цепи РНК. Очевидно, что подобно тому как 100 Å-фибрилла нуклеосом укладывается в структуры высшего порядка, так и первичная РНП-фибрилла подвергается дальнейшему складыванию и упаковке. Это тем более просто, что РНК в отличие от ДНК весьма гибкая молекула и никаких запретов для ее изгибания под любым углом нет. Какие законы управляют вторичным складыванием фибриллы РНП — не известно. Не исключено, что вторичное складывание играет важную роль в процессах сплайсинга, например сближая между собою границы интрона.

Ядерные РНП-частицы образуют контакты с ядерным

матриксом. Еще в наших ранних опытах с Ю. С. Ченцовым было показано, что нуклеомемы ядерного скелета содержат РНК. Далее Ш. Пенман (США) показал, что при выделении ядерного матрикса большая часть гяРНК остается в связанном с ним состоянии, если при выделении полностью исключить РНКазную деградацию РНК.

Наш метод выделения гяРНК из ядер печени крысы, включающий длительные экстракции разбавленными солевыми растворами при рН 7,8—8,0, базируется на слабом РНКазном гидролизе исходных комплексов, что ведет к их отщеплению от ядерного скелета. Очень слабая РНКазная деградация идет, очевидно, даже в присутствии ингибитора РНКазы. Именно поэтому наш метод оказался не эффективным при работе с ядрами, лишенными заметной РНКазной активности (например, клетки He La). Тогда, однако, удавалось извлечь 30S-частицы, если экстрагировать ядра не при 0°, а при 30°.

Чтобы избежать этих сложностей, многие авторы использовали вместо экстракции раствором НМТ, рН 8, механическое разрушение клеточных ядер с помощью ультразвука. При этом происходит эффективная солюбилизация гяРНК, но полученные частицы крайне гетерогенны по своему белковому составу — они практически не отличаются от препаратов ядерного матрикса, хотя и в их составе можно видеть информатин.

Таким образом, ультразвуковое облучение разрушает ядерный матрикс и освобождает гяРНК вместе с прикрепленными к ним фрагментами ядерного скелета. Поэтому такие препараты вряд ли адекватны для изучения структуры гяРНК, но они могут быть использованы для выяснения природы взаимодействия гяРНК с ядерным скелетом. К сожалению, к настоящему моменту никаких данных о природе этих взаимодействий нет. Между тем вопрос этот очень важный, ибо такие взаимодействия могут играть важнейшую роль в процессах ядерно-цитоплазматического транспорта мРНК.

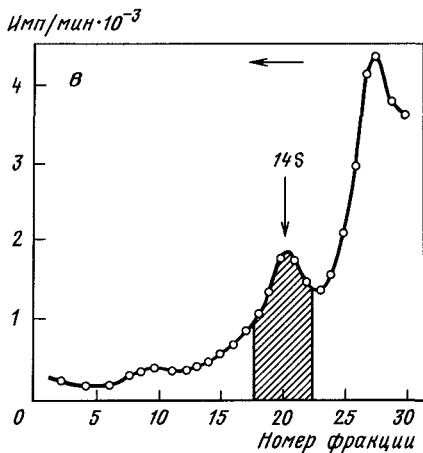
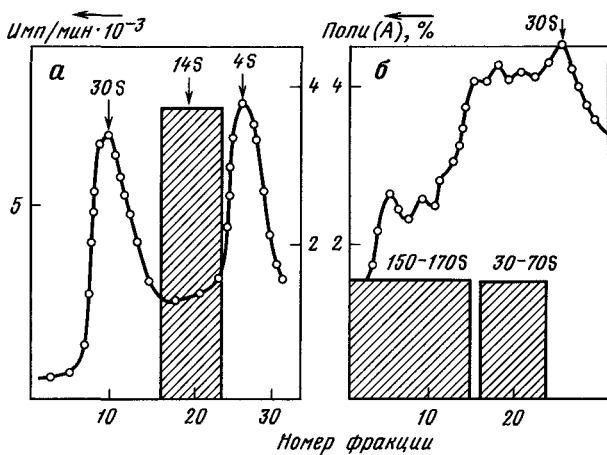
5.8. Другие классы ядерных РНП-частиц

Литература: [240, 241]

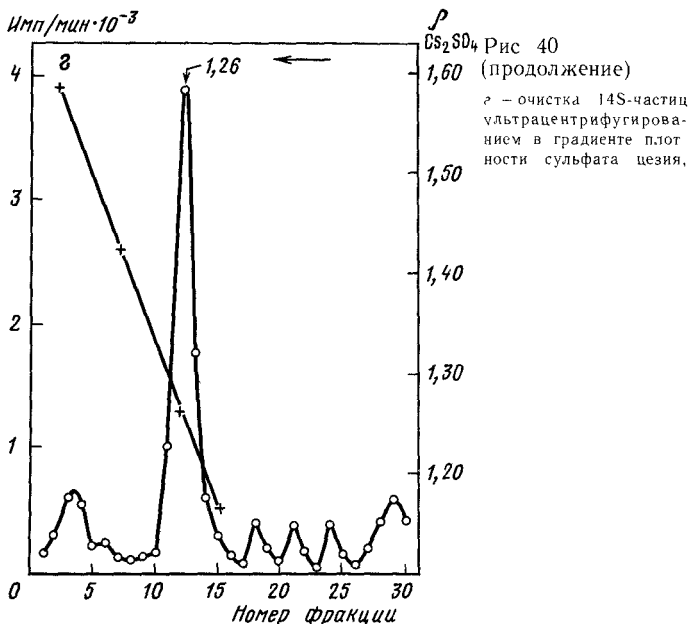
Хотя выше мы отмечали гомогенность ядерных РНП-частиц, из этого общего правила есть исключение. Оно касается 3'-концевой последовательности поли(А), присоединяющейся к гяРНК после завершения транскрипции и отсеечения лишнего 3'-концевого фрагмента (созревание 3'-конца мРНК). Впервые частица, содержащая поли(А)-конец гяРНК, была описана О. П. Самариной и Ж. Бессоном, которые обнаружили поли(А) в составе поличастиц, но не нашли ее в 30S-частицах (рис. 40). Тогда они просмотрели все фракции вдоль сахарозного градиента и обнаружили поли(А) в составе компонента с константой седиментации 14S. Было ясно, что эти частицы отщеплялись от нативных РНП-комплексов при действии РНКазы; 14S частицы были далее очищены и определен их полипептидный состав. Оказалось, что они не содержат информатина, но в них открывается характерный набор из нескольких других полипептидов. По крайней мере, один из них сопровождает мРНК при ее переносе в цитоплазму. Помимо промРНП (или гяРНП), рядом авторов, начиная с Х. Буша и Т. Педерсона (США), в клеточном ядре были выявлены РНП-частицы другого типа, а именно мяРНП, содержащие малые ядерные РНК. В настоящее время описано 7 мяРНК, обозначаемых как U1, U2 и т. д. Большая часть их синтезируется РНК-полимеразой II и содержит кэпы. Размеры мяРНК составляют от 80 до 250 нуклеотидов. В состав мяРНК, помимо РНК, входит несколько полипептидов, среди которых есть полипептиды, характерные для данного

Рис. 40. Выявление особых частиц, включающих в свой состав поли(А), находящиеся на 3'-концах гяРНК

а, б - распределение поли(А) вдоль сахарозного градиента после ультрацентрифугирования ядерных РНП-частиц, выделенных без добавления ингибитора РНКазы (а) и с ингибитором РНКазы (б) Видно, что поли(А) входит в состав тяжелых полирибонуклеосом, но ее нет в 30S частицах. Вместо этого поли(А) входит в состав 14S-компонента;



а — очистка 14S-частиц, содержащих поли(А), путем повторного ультрацентрифугирования в сахарозном градиенте;



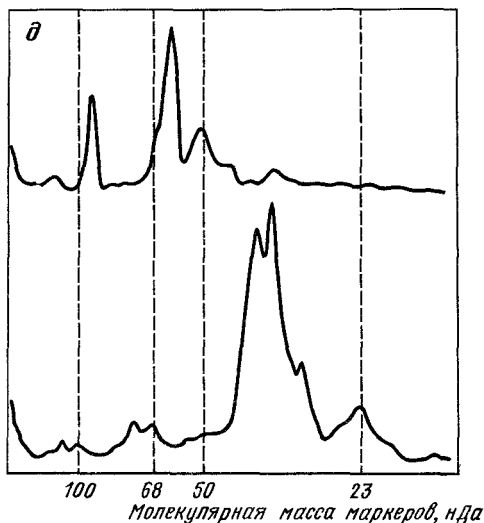
РНП, и полипептиды, общие для нескольких разных РНП. Это показано с помощью иммунного анализа с использованием сыворотки пациентов с некоторыми видами красной волчанки, у которых вырабатываются антитела к белкам мяРНП.

Обычно мяРНП ассоциируются с нативными комплексами про-мРНП, что служит указанием на их возможную роль в процессинге (см. ниже).

Наконец, следует упомянуть, что в составе ядрышек выявляются частицы, содержащие 45S-рРНК, т. е. про-рРНК, и ряд производных частиц. В них наряду с некоторыми рибосомными белками присутствуют чисто ядерные белки, которые, очевидно, участвуют в процессинге рРНК

Рис. 40
(окончание)

а сравнение по липидного состава 14S поли(А) частиц (сверху) и 30S-рибонуклеосом (внизу) с помощью геле-электрофореза в присутствии додецил сульфата натрия (сканирование электрофореграмм, окрашенных бромфеноловым синим). Материал выделяли из ядер печени крысы (по результатам, полученным О. П. Самариной и соавт.)



и созревании рибосом. Поскольку, однако, биогенез рибосом не является предметом изложения, я не останавливаюсь на деталях их организации.

5.9. Резюме

Все РНК, присутствующие в клеточном ядре, входят в состав РНП-частиц разного типа. ПромРНП (гяРНП) имеют регулярную и монотонную структуру, в которой отрезки РНК длиной ~ 600 нуклеотидов намотаны на белковые глобулы, информомеры, соединенные между собой отрезками линкерной РНК. Каждый информомер состоит из десятков полипептидных цепей - информатинов нескольких типов. В составе таких комплексов, упакованных далее в структуры высшего порядка и ассоциированных с разными мРНК, ядерная РНК подвергается процессингу, в ходе которого образуется зрелая мРНК. При переносе ее в цитоплазму информомеры остаются в ядре.

Глава шестая

РАБОТА ГЕНА И ЕГО РЕГУЛЯЦИЯ НА УРОВНЕ ЯДЕРНОЙ РНК: ПРОЦЕССИНГ про-мРНК И СОЗРЕВАНИЕ мРНК

В предыдущем разделе мы рассмотрели основные черты структурной организации новообразованной РНК в клеточном ядре. В настоящем разделе кратко излагаются данные о том, каким образом происходит процессинг РНК, входящей в состав ядерных РНП. К сожалению, в решении этих вопросов советские исследователи вообще не принимали участия.

6.1. Сплайсинг

Сплайсинг про-мРНК в клеточном ядре [242—247]. Центральным событием процессинга, естественно, является сплайсинг про-мРНК. К сегодняшнему дню усилиями многих групп (В. Келлер, ФРГ, Ф. Шарп, Т. Маниатис, Дж. Стейц, США, и др.) расшифрованы основные этапы сплайсинга. Удалось выделить ряд промежуточных компонентов и ряд необходимых для сплайсинга факторов, используя как клеточные, так и бесклеточные системы сплайсинга.

Первым этапом сплайсинга про-мРНК является разрыв фосфодиэфирной связи у 5'-конца интрона. Далее, освободившийся фосфорилированный 5'-конец интрона (pGrUpN...) переносится к участку, расположенному на расстоянии ~ 30 нуклеотидов от 3'-конца интрона, и присоединяется к 2'-гидроксильной группе аденозина. В этом месте в интроне располагается сильно вырожденная последовательность PuPuPuAPu... (Pu — пиримидин,

Ри — пуриннуклеотид). Образуется структура типа «лассо». Третий этап — атака свободным 3'-гидроксилом экзона фосфодиэфирной связи у 3'-конца интрона. В результате образуется нормальная фосфодиэфирная связь между экзонами и вырезание интрона в виде лассо (рис. 41).

Сплайсинг, таким образом, — достаточно сложный процесс. Он осуществляется макромолекулярным комплексом, носящим название сплайсосомы. В состав последней входят рибонуклеосома и ряд белков. Кроме них, большая роль в сплайсинге принадлежит малым ядерным РНК (мяРНК), входящим в состав мяРНКП.

Уже давно обнаружено, что последовательность у 5'-конца одной из мяРНК, называемой U1, комплементарна усредненной 9-нуклеотидной последовательности, расположенной на 5'-границе интрона. Действительно, мяРНК U1 необходима для сплайсинга. Инъекция в ядро антител к белкам РНКП частиц, содержащих РНК U1, блокирует сплайсинг. Разрушение 5'-конца этой РНК также его подавляет, тогда как 3'-конец РНК U1 можно разрушить, сохранив активность последней. Более детальные исследования показали, что РНК U1 нужна для первого этапа сплайсинга (отщепления 5'-конца интрона) и, видимо, только для него. Для второго этапа, образования лассо, необходим другой тип мяРНК, который содержит мяРНК U2. Последняя, вероятно, может образовывать дуплекс с вовлекаемым в образование лассо участком интрона вблизи от А. Получены данные, что третий этап реакции осуществляется при участии еще одной мяРНК, а именно U5. Наконец, каким-то образом в процесс сплайсинга вовлечены еще мяРНК U4 и U6.

Итак, большая роль в реакции сплайсинга принадлежит мяРНК, причем последние участвуют в этом процессе через образование дуплексов со специфическими отрезками про-мРНК. Следовательно, мяРНК играют активную роль в узнавании мест сплайсинга. Из этого вытекают интересные возможности. Весьма вероятно, что существует еще се-

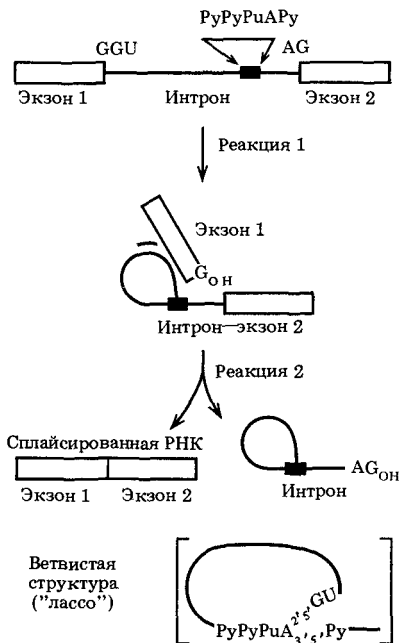


Рис 41 Основные этапы реакции сплайсинга в гяРНК эукариот (схема) (по результатам, полученным Дж Абельсоном и соавт)

рия мяРНК или вариантов U1 и U2, которые несколько отличаются от них по нуклеотидным последовательностям в местах узнавания. Тогда такие варианты мяРНК будут предпочтительно связываться с участками, отличными от канонических, и обеспечивать сплайсинг по другим местам. Таким образом, можно было бы объяснить тканеспецифический сплайсинг наличием разного набора мяРНК

в разных тканях. Вопрос этот требует дальнейшего изучения.

Аутокаталитический сплайсинг [248—250]. Одной из главных сенсаций при изучении сплайсинга явилось открытие аутокаталитического сплайсинга у про-рРНК тетрахимены, а затем и в ряде других систем Т. Чех и соавт. (США) показали, что вырезание 400-нуклеотидного интрона из про-рРНК тетрахимены идет при инкубации чистой РНК в присутствии ионов Mg^{2+} и GMP. Последний можно заменить на GTP, GDP или просто гуанозин. Таким образом, была открыта возможность биокатализа при участии самой РНК, что имеет огромное биологическое значение.

Аутосплайсинг идет через следующие этапы (рис. 42): 1) 3'-гидроксил гуанозина атакует фосфодиэфирную связь ($-UrA-$) у 5'-конца интрона и присоединяется к нему через нормальную 3'—5' фосфодиэфирную связь ($GpA-$); 2) освободившийся 3' — ОН-конец ($-U-OH$) экзона атакует фосфодиэфирную связь ($-GpU-$) у 3'-конца интрона, в результате чего экзоны соединяются ($-UrU-$); 3) освободившийся 3' — ОН-конец ($-G-OH$) интрона атакует фосфодиэфирную связь ($-UrA-$) внутри интрона, что ведет к образованию из интрона двух цепей РНК: кольцевой (содержит $-GpA-$) и линейной ($pGpA-\dots-U-OH$).

Таким образом, сплайсинг двух экзонов и вырезание интрона в форме двух цепей РНК является результатом трех последовательных реакций переноса фосфодиэфирной связи. Очевидно, в РНК образуется такая вторичная структура, что, во-первых, определенные участки РНК сближаются, а во-вторых, снижается энергетический барьер для реакции переноса фосфодиэфирной связи. На самом деле, *in vivo* в реакции сплайсинга про-рРНК участвует также и белок, но его роль не каталитическая, а сводится к поддержанию оптимальной для сплайсинга конфигурации про-рРНК.

Аутосплайсинг выявлен и в ряде других случаев. В ми-

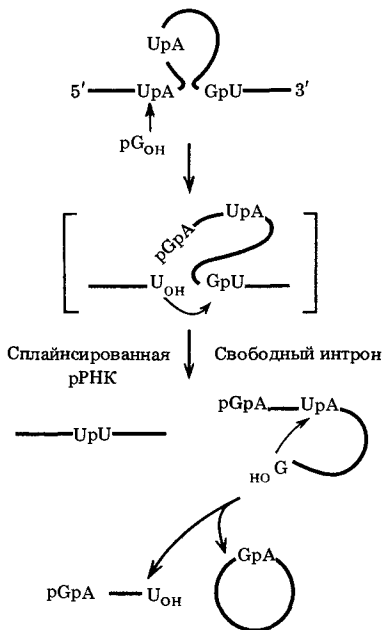


Рис 42 Основные этапы самосплайсинга (автокаталитического сплайсинга) рРНК тетраимейи (схема) (по результатам, полученным Т Чехом и соавт)

тохондриях сплайсинг ряда классов РНК осуществляется путем РНК-катализа, а белкам опять-таки принадлежит лишь вспомогательная функция. Не исключено, что и в описанном выше сплайсинге про-мРНК роль мяРНК не является пассивной, но этот вопрос требует дальнейшего изучения.

Открытие РНК катализа на примере самосплайсинга легло в основу новых эволюционных теорий, согласно которым первичной формой живой материи была самовоспроизводимая молекула РНК. Сейчас описано еще нес-

колько примеров биокатализа, осуществляемого РНК. Так, созревание некоторых тРНК у бактерий осуществляется РНКазой Р, в составе которой выявлена особая РНК. Оказалось, что именно эта РНК является ферментом, и она может сама, без белка, расщеплять молекулу РНК. Наконец, некоторые олигонуклеотиды могут катализировать полимеризацию нуклеозидтрифосфатов по своей матрице. Вероятно, с течением времени появятся еще примеры реакций, катализируемых не белком, а РНК. Здесь же я хотел бы лишь еще раз подчеркнуть особую роль РНК в организации сплайсинга, основного этапа процессинга про-мРНК.

6.2. Другие процессы созревания мРНК и роль мяРНК

Литература: [251, 252]

Интересно, что и другие процессы созревания мРНК катализируются при участии мяРНК. М. Бирнстил (Швейцария) исследовал формирование 3'-конца у гистоновой мРНК (Н2а) морского ежа в овоцитах лягушки. При инъекции в ядра плазмиды, содержащей гистоновые гены в овоцитах, шла правильная инициация Н2а-мРНК, но не происходило правильного образования ее 3'-конца. Тогда были взяты ядерные экстракты эмбрионов морского ежа и введены в цитоплазму овоцитов лягушки. Введенный материал проникал в ядро и, как оказалось, вызывал формирование правильного 3'-конца мРНК. Очистка активного начала из экстракта показала, что им является новый тип мяРНК, названный U7. Введения только этой РНК или соответствующего РНП было достаточно для формирования правильного 3'-конца мРНК. Как известно, гистоновые мРНК не имеют сигналов для полиаденилирования и их 3'-конец отличается от 3'-конца большинства других мРНК. Однако и его формирование происходит путем эндонуклеазного расщепления в определенной точке про-мРНК.

Следовательно, мяРНК U7 является фактором, определяющим место расщепления про-мРНК, ведущего к формированию 3'-конца зрелой мРНК.

Сейчас накапливаются данные, что в формировании 3'-конца обычных полиаденилированных мРНК участвует определенная фракция мяРНК, узнающая AAUAAA и другие сигнальные последовательности в мРНК.

Регуляция генной экспрессии, естественно, не ограничивается уровнями транскрипции и процессинга про-мРНК. Она может происходить на этапе ядерно-цитоплазматического транспорта (совершенно не изученный процесс!), на уровне трансляции и, наконец, путем контроля времени жизни белков. Эти проблемы, однако, выпадают за рамки настоящей книги.

6.3. Резюме

Таким образом, вновь синтезированная РНК подвергается в ядре в ходе процессинга сложным превращениям, включающим прежде всего сплайсинг и созревание 3'-конца. Оба эти процесса происходят при участии различных мяРНК, входящих в состав мяРNP. Не исключено, что последние выполняют ферментативные функции. Оба процесса могут регулироваться в ядрах, давая альтернативный сплайсинг и формирование альтернативных 3'-концов, содержащих поли(А). Возможно, что при этом регуляторная роль принадлежит вариантам мяРНК.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Мы рассмотрели общие вопросы структуры и функционирования генетического аппарата в клетках высших организмов на уровне дезоксирибонуклеопротеидов и рибонуклеопротеидов клеточного ядра. Это — та область, в которой концентрировались исследования нашей лаборатории на протяжении более чем 25 лет. Другое магистральное направление в последние годы составляли работы по мобильным генетическим элементам.

Как уже отмечалось в предисловии, характер самих докладов на президиуме и отделении АН СССР определял концентрирование прежде всего на тех вопросах, которые разрабатывались в лаборатории, таких, как открытие и изучение структурной организации ядерной про-мРНК (гяРНК) и содержащих ее рибонуклеопротеидных частиц, изучение ядерного остова и его взаимодействия с петлями ДНК, выяснение организации транскрипционно активного хроматина и некоторых других.

Один из разделов книги к моменту ее выхода начинает устаревать. За это время появилось много новых работ по клонированию и изучению генов разных регуляторных белков хроматина и по выяснению механизмов их действия. В таких белках выявлены по крайней мере два домена: область, узнающая специфическую последовательность ДНК, и активирующая область. Первый домен может быть представлен или пространственной структурой α -спираль—соединительный полипептид— α -спираль, или так называемыми Zn-пальцами (полипептиды, содержащие цистеиновые и гистидиновые остатки, взаимодействующие с Zn), или положительно заряженными отрезками. Второй, активирующий домен — это обычно отрицательно заряженная область, но иногда он представлен участками, обогащенными глутамином или пролином. Активирующая область взаимодействует с определенным участком РНК-полимеразы, состоящим из повторяющихся гептапептидов, бога-

тых С—ОН-группами. Основной механизм действия таких белков — связывание с модулями энхансеров или сайленсеров через первый домен и взаимодействие с РНК-полимеразой или другими регуляторными белками через активирующий домен. Процесс в этой области необычайно стремителен. Крупным достижением явилось также выделение генов и белков, экспрессия которых достаточна для превращения одной ткани в другую.

Сейчас одной из центральных проблем общей молекулярной биологии гена по-прежнему является проблема дифференциальной активности генов, т. е. регуляции их активности. Здесь есть еще множество нерешенных вопросов и почва для новых фундаментальных открытий. Отсюда можно перекинуть мост и к пониманию механизмов развития от зиготы до взрослого организма.

Значительный прогресс ожидается сейчас на пути клонирования, изучения структуры и функционирования индивидуальных регуляторных белков клеточного ядра. Это задача на ближайшие годы, и ее решение даст крайне много для понимания проблемы в целом.

Общая молекулярная биология гена питает многочисленные реки частной молекулярной биологии гена, т. е. детального изучения генов, связанных с выполнением клеткой определенных биологических функций. Это — молекулярные иммуногенетика, онкогенетика, эмбриогенетика, в которых достигнуты большие успехи, только еще набирающая силу молекулярная нейrogenетика и многие другие.

В этих областях молекулярная биология гена стоит на службе у соответствующих научных дисциплин, но прогресс последних без нее стал просто невозможным. Лишь знание соответствующих генов, их структуры и регуляции позволяет добиться того стремительного развития, которое мы наблюдали за последние годы в иммунологии и онкологии. Таким образом, рассмотренные в этой книге вопросы связаны в той или иной мере практически со всеми проблемами современной экспериментальной биологии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 *Avery O T, MacLeod C M, McCarthy M* Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types // *J Exp Med* 1944 Vol 79 P 137—158
- 2 *Watson J D, Crick F H C* A structure for deoxyribose nucleic acid // *Nature* 1953 Vol 171 P 737—738
- 3 *Watson J D* The double helix L. Atheneum, 1968 152 p
- 4 *Volkin E, Astrachan L* Phosphorus incorporation in *Escherichia coli* RNA after infection with bacteriophage T2 // *Virology* 1956 Vol 2 P 149—161
- 5 *Belozerski A N, Spirin A S* A correlation between the compositions of deoxyribonucleic and ribonucleic acids // *Nature* 1958 Vol 182 P 111—112
- 6 *Jacob F, Monod J* Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins // *J Mol Biol* 1961 Vol 3 P 318—356
- 7 *Brenner S, Jacob F, Meselson M* An unstable intermediate carrying information from genes to ribosomes for protein synthesis // *Nature* 1961 Vol 190 P 576—580
- 8 *Gros F, Hiatt H, Gilbert W, Kurland G G, Risenbrough R W, Watson J D* Unstable ribonucleic acid revealed by pulse labelling of *Escherichia coli* // *Ibid* P 581—585
- 9 *Nirenberg M W, Matthaei J H* The dependence of cell free protein synthesis in *E coli* upon naturally occurring or synthetic polyribonucleotides // *Proc Nat Acad Sci US* 1961 Vol 47 P 1588—1602
- 10 *Crick F H C, Barnett L, Brenner S, Watts Tobin R J* General nature of the genetic code for proteins // *Nature* 1961 Vol 192 P 1227—1232
- 11 *Георгиев Г П* Быстрый метод получения ДНК в высокополимерном состоянии // *Биохимия* 1959 Т 24 С 472—480
- 12 *Георгиев Г П, Мانتьева В Л* Выделение клеточных ядер фенольным методом и их характеристика // Там же 1960 Т 25 С 143—150
- 13 *Георгиев Г П* Рибонуклеиновая кислота хромосомно ядрышкового аппарата // Там же 1961 Т 26 С 1095—1107

- 14 Георгиев Г П, Мантьева В Л О существовании РНК АУ-типа в хромосомно-ядрышковом аппарате // Вопр мед химии 1962 Т 8 С 93—94
- 15 Sibatani A, De Kloet S R, Allfrey V G, Mirsky A E Isolation of nuclear RNA fraction resembling DNA in its base composition // Proc Nat Acad Sci US 1962 Vol 48 P 471—474
- 16 Georgiev G P, Mantieva V L The isolation of DNA-like RNA and ribosomal RNA from the nucleolo chromosomal apparatus of mammalian cells // Biochim et biophys acta 1962 Vol 61 P 153 -154
- 17 Георгиев Г П, Мантьева В Л Информационная и рибосомная РНК хромосомно ядрышкового аппарата, методы разделения и нуклеотидный состав // Биохимия 1962 Т 27 С 949—957
- 18 Samarina O P, Mantieva V L, Ryskov A P, Georgiev G P The hot phenol extraction of RNA, particularly nuclear dRNA // Methodological developments in biochemistry L Longman, 1973 Vol 2 Preparative technique / Ed E Reid P 131—143
- 19 Georgiev G P, Samarina O P, Lerman M I, Smirnov M N Biosynthesis of messenger and ribosomal RNAs in the nucleolo chromosomal apparatus of animal cells // Nature 1963 Vol 200 P 1291 -1294
- 20 Samarina O P The distribution and properties of cytoplasmic DNA like RNA (messenger RNA) // Biochim et biophys acta 1964 Vol 91 P 686—687
- 21 Самарина О П, Лерман М И, Туманян В Д, Ананьева Л Н, Георгиев Т П Характеристика хромосомной информационной РНК // Биохимия 1965 Т 30 С 880—893
- 22 Yoshikawa-Fukada M, Fukada J, Kawada Y Characterization of rapidly labeled RNA of animal cells in culture // Biochim et biophys acta 1965 Vol 103 P 383—398
- 23 Scherrer K, Marcaud L, Zaidela F, London I M, Gros F Patterns of RNA metabolism in differentiated cells A rapidly labeled unstable 60S RNA with messenger properties in duck erythroblasts // Proc Nat Acad Sci US 1966 Vol 56 P 1571 -1575
- 24 Warner J R, Soetro R, Birnboim C, Girard M, Darnell J E Rapidly labeled HeLa cell nuclear RNA 1 Identification by zone sedimentation of a heterogeneous fraction separate from ribosomal precursor RNA // J Mol Biol 1966 Vol 19 P 349 361
- 25 Attardi G, Parnas H, Hwang M I H, Attardi B Giant size rapidly labeled nuclear ribonucleic and cytoplasmic messenger ribonucleic acid in immature duck erythroblasts // Ibid Vol 20 P 145 182

- 26 Газарян К Г, Шуппе Н Г, Прокошкин Б Д Некоторые вопросы биосинтеза РНК в клетках животных // Биохимия 1966 Т 31 С 108—116
- 27 Britten R J, Kohne E D Repeated sequences in DNA // Science 1968 Vol 161 P 529—540
- 28 Davidson E H, Graham D E, Neufeld B R, Chamberlin M E, Amerson C S, Hough B R, Britten R J Arrangement and characterization of repetitive sequence elements in animal DNAs // Cold Spring Harbor Symp Quant Biol 1974 Vol 38 P 295—302
- 29 Manning J E, Schmid K W, Davidson N Interspersion of repetitive and non-repetitive DNA sequences in the *Drosophila melanogaster* genome // Cell 1975 Vol 4 P 141—155
- 30 Georgiev G P Metabolism of nuclear RNA fractions // The cell nucleus Metabolism and radiosensitivity L Taylor and Francis, 1966 P 79—85
- 31 Арион В Я, Георгиев Г П О функциональной гетерогенности хромосомной информационной РНК // Докл АН СССР 1967 Т 172 С 716—719
- 32 Georgiev G P On the structural organization of operon and the regulation of RNA synthesis in animal cells // J Theor Biol 1969 Vol 25 P 473—490
- 33 Britten R J, Davidson E H Gene regulation for higher cells A theory // Science 1969 Vol 165 P 349—357
- 34 Maniatis T, Fritsch E F, Sambrook J Molecular cloning Cold Spring Harbor, 1982 545 p
- 35 Smith H O Nucleotide sequence specificity of restriction endonucleases // Science 1970 Vol 205 P 455—462
- 36 Southern E M Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis // J Mol Biol 1975 Vol 98 P 503—517
- 37 Rigby P W J, Dieckmann M, Rhodes C, Berg P Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I // Ibid 1977 Vol 113 P 237—252
- 38 Temin H, Baltimore D RNA directed DNA synthesis and RNA tumor viruses // Adv Virus Res 1972 Vol 17 P 129—186
- 39 Jackson D A, Symons R H, Berg P Biochemical method for inserting new genetic information into DNA of simian virus 40 circular SV40 DNA molecules containing lambda phage genes and the galactose operon of *Escherichia coli* // Proc Nat Acad Sci US 1972 Vol 69 P 2904—2909
- 40 Василенко С К, Демушкин В П, Будовский Э И, Кнорре Д Г Определение нуклеотидной последовательности в олигонуклеотидах // Докл АН СССР 1965 Т 162 С 694—697

- 41 *Sverdlov E D, Monastyrskaya G S, Budowsky E I, Grachev M A* A novel approach to structural analysis of oligo nucleotides // FEBS Lett 1972 Vol 28 P 231-235
- 42 *Mirzabekov A D, Melnikova A F* Localization of chromatin proteins within DNA grooves by methylation of chromatin with dimethyl sulphate // Mol Biol Rep 1974 Vol 1 P 385-390
- 43 *Gilbert W, Maxam A, Mirzabekov A* Contacts between the lac repressor and DNA revealed by methylation // Control of ribosome synthesis / Ed N Kjeldgaard, O Maale Copenhagen Munksgaard, 1976 P 139-148
- 44 *Maxam A M, Gilbert W* A new method for sequencing DNA // Proc Nat Acad Sci US 1977 Vol 74 P 560-564
- 45 *Sanger F, Nicklen S, Coulson A R* DNA sequencing with chain-terminating inhibitors // Ibid P 5463-5467
- 46 *Chow L T, Gelinas R E, Broker T R, Roberts R J* An amazing sequence arrangement at the 5' ends of Adenovirus 2 messenger RNA // Cell 1977 Vol 12 P 1-8
- 47 *Berget S M, Moore C, Sharp P A* Spliced segments at the 5' terminus of Adenovirus 2 late mRNA // Proc Nat Acad Sci US 1977 Vol 74 P 3171-3175
- 48 *Jeffreys A J, Flavell R A* The rabbit beta globin gene contains a large insert in the coding sequence // Cell 1977 Vol 12 P 1097-1108
- 49 *Tilghman S M, Tiemeier D C, Seidman J C, Peterlin B M, Sullivan M, Maizel J V, Leder P* Intervening sequence of DNA identified in the structural portion of a mouse beta-globin gene // Proc Nat Acad Sci US 1978 Vol 75 P 725-729
- 50 *Breathnach R, Mandel J L, Chambon P* Ovalbumin gene is split in chicken DNA // Nature 1977 Vol 270 P 314-319
- 51 *Wozney J, Hanahan D, Tate V, Boedtker H, Doty P* Structure of the pro alpha (2) (1) collagen gene // Ibid 1981 Vol 294 P 129-135
- 51a *Breathnach R, Chambon P* Organization and expression of eukaryotic split genes coding for proteins // Annu Rev Biochem 1981 Vol 50 P 349-383
- 52 *Mount S M* A catalogue of splice junction sequences // Nucl Acids Res 1982 Vol 10 P 459-472
- 53 *Чумаков П М, Иоцова В С, Георгиев Г П* Выделение плазмидных клонов, содержащих последовательность мРНК для невирусного Т антигена мыши // Докл АН СССР 1982 Т 267 С 1272-1275
- 54 *Бухман В Л, Нинкина Н Н, Самарина О П, Матвеева О В, Чумаков П М, Георгиев Г П* Молекулярная организация

- полного гена, кодирующего клеточный опухолевый антиген (p53) человека // Там же 1987 Т 292 С 223—226
- 55 *Yenikolopov G N, Kuzin B A, Ludwig M Z, Korochkin L I, Georgiev G P* The cloning and expression of the gene encoding organ-specific esterase S from the genome of *Drosophila virilis* // *EMBO J* 1983 Vol 2 P 1—7
 - 56 *Gilbert W* Why genes in pieces? // *Nature* 1978 Vol 271 P 501
 - 57 *Griffin B E* Structure and genomic organization of SV40 and polyoma virus // *DNA tumor viruses* / Ed J Tooze Cold Spring Harbor, 1980 P 61—124
 - 58 *Laski F A, Rio D C, Rubin G M* Tissue specificity of *Drosophila* P element transposition is regulated at the level of mRNA splicing // *Cell* 1986 Vol 44 P 7—19
 - 59 *Treisman R, Orkin S H, Maniatis T* Specific transcription and RNA splicing defects in five cloned β thalassaemia genes // *Nature* 1983 Vol 302 P 591—596
 - 60 *Лимборская С А, Бухман В Л, Просняк М И, Федоров А Н, Слонимский П А, Нинкина Н Н, Рысков А П* Изучение молекулярных причин талассемии IV Клонирование β -глобинового гена больного β -талассемией из Азербайджана и определение точковой мутации в малом интроне // *Генетика* 1987 Т 23 С 228—237
 - 61 *Edmonds M P, Vaughan M H, Nakazoto H* Polyadenylic acid sequences in the heterogeneous nuclear RNA and rapidly labeled polysomal RNA in HeLa cells possible evidence for a precursor relationship // *Proc Nat Acad Sci US* 1971 Vol 68 P 1336—1340
 - 62 *Braverman G* The role of the poly(A) sequence in mRNA // *Crit Rev Biochem* 1981 Vol 10 P 1—38
 - 63 *Shatkin A* Capping of eukaryotic mRNAs // *Cell* 1976 Vol 9 P 645—654
 - 64 *Fitzgerald M, Shenk T* The sequence 5'-AAUAAA 3' forms part of the recognition site for polyadenylation of late SV40 mRNA // *Ibid* 1981 Vol 24 P 251—260
 - 65 *Caput P, Beutler B, Hartog K, Thayer R, Brown-Shmer S, Gerami A* Identification of a common nucleotide sequence in the 3'-untranslated region of mRNA molecules specifying inflammatory mediators // *Proc Nat Acad Sci US* 1986 Vol 83 P 1670—1674
 - 66 *Shaw G, Kamen R* A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation // *Cell* 1986 Vol 46 P 659—667
 - 67 *McKnight S L, Kingsbury R* Transcriptional control signals of eukaryotic protein coding gene // *Science* 1982 Vol 217 P 316—324

68. *Myers R. M., Lerman L. S., Maniatis T.* A general method for saturation mutagenesis of cloned DNA fragments // *Ibid.* 1983. Vol. 229. P. 242—247.
69. *Cochran M. D., Weissmann C.* Modular structure of the β -globin and TK promoters // *EMBO J.* 1984. Vol. 3. P. 2453—2459.
70. *Shenk T.* Transcriptional control regions: nucleotide sequence requirements for initiation by RNA polymerase II and III // *Curr. Top. Microbiol. and Immunol.* 1981. Vol. 93. P. 25—46.
71. *Grosschedl R., Birnstiel M. L.* Spacer DNA sequences upstream of the TATA sequence are essential for promotion of H2a gene transcription in vivo // *Proc. Nat. Acad. Sci. US.* 1980. Vol. 77. P. 7102—7106.
72. *Banerji J., Ruscon S., Schaffner W.* Expression of a β -globin gene is enhanced by remote SV40 DNA sequences // *Cell.* 1981. Vol. 27. P. 299—308.
73. *Gluzman Y., Shenk T.* Enhancers and eukaryotic gene expression. Cold Spring Harbor, 1983. 200 p.
74. *Khoury G., Gruss P.* Enhancer elements // *Cell.* 1983. Vol. 33. P. 313—314.
75. *Herr W., Clarke J.* The SV40 enhancer is composed of multiple functional elements that can compensate for one another // *Ibid.* 1986. Vol. 45. P. 461—470.
76. *Dorsch-Häsler K., Keil G. M., Weber F., Jasin M., Schaffner W., Koszinowski U. H.* A long and complex enhancer activates transcription of the gene coding for the highly abundant immediate early mRNA in murine cytomegalovirus // *Proc. Nat. Acad. Sci. US.* 1985. Vol. 82. P. 8325—8329.
77. *Gilles S. D., Morrison S. L., Oi V. T., Tonegawa S. A.* A tissue-specific transcription enhancer element is located in the major intron of a rearranged immunoglobulin heavy chain gene // *Cell.* 1983. Vol. 33. P. 717—728.
78. *Banerji J., Olson L., Schaffner W.* A lymphocyte-specific cellular enhancer is located downstream of the joining region in immunoglobulin heavy chain genes // *Ibid.* P. 729—740.
79. *Queen C., Baltimore D.* Immunoglobulin gene transcription is activated by downstream sequence elements // *Ibid.* P. 741—748.
80. *Theisen M., Stief A., Sippel A. E.* The lysozyme enhancer: cell-specific activation of the chicken lysozyme gene by a far-upstream DNA element // *EMBO J.* 1986. Vol. 5. P. 719—724.
81. *Chambon P., Gaub M. P., Lepennac J. P., Dierich A., Astinotti D.* Steroid hormones relieve repression of the ovalbumin gene promoter in chick oviduct tubular gland cells // *Endocrino-*

- logy / Ed. F. Labrio, L. Prouix. Amsterdam: Excerpta medica, 1984. P. 103–120.
82. Brand A. H., Breeden L., Abraham J., Sternglanz R., Nasmyth K. Characterization of a «silencer» in yeast: a DNA sequence with properties opposite to those of a transcriptional enhancer // *Cell*. 1985. Vol. 41. P. 41–48.
 83. Laimins L., Holmgren-König M., Khoury G. Transcriptional «silencer»-element in rat repetitive sequences associated with the rat insulin I gene locus // *Proc. Nat. Acad. Sci. US*. 1986. Vol. 83. P. 3151–3155.
 84. Falck-Pederson E., Logan J., Shenk T., Darnell J. E. Transcription termination within the E1A gene of adenovirus induced by insertion of the mouse β -major globin terminator element // *Cell*. 1985. Vol. 40. P. 897–905.
 85. Hentschel C. C., Birnstiel M. L. The organization and expression of histone gene families // *Ibid.* 1981. Vol. 25. P. 301–313.
 86. Efstratiadis A., Posakony J. W., Maniatis T., Lawn R. M., O'Connell C., Spritz R. A., Deriel J. K., Forget B. G., Weissman S. M., Slightorn J. L., Blechl A. E., Smithies O., Baralle F. E., Shoulders C. C., Proudfoot N. J. The structure and evolution of the human β -globin family // *Ibid.* 1980. Vol. 21. P. 653–668.
 87. Недоспасов С. А., Шахов А. Н., Турецкая Р. Л., Метт В. А., Георгиев Г. П., Добрынин В. Н., Коробко В. Г. Молекулярное клонирование генов человека, кодирующих факторы некроза опухолей: тандемное расположение альфа- и бета-генов в коротком сегменте (6 тыс. пар нуклеотидов) генома человека // *Докл. АН СССР*. 1985. Т. 285. С. 1487–1490.
 88. Felsenfeld G. Chromatin // *Nature*. 1978. Vol. 271. P. 115–122.
 89. Hewish D. R., Burgoyne L. A. Chromatin substructure: the digestion of chromatin at regulatory spaced sites by a nuclear DNase // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 1973. Vol. 52. P. 504–510.
 90. Van Holde K. E., Sahasrabudde C. G., Shaw B. R., Van Bruggen E. F. J., Arnberg A. C. A model for particulate structure in chromatin // *Nucl. Acids Res.* 1974. Vol. 1. P. 1579–1586.
 91. Olins A. L., Olins D. E. Spheroid chromatin units (ν -bodies) // *Science*. 1974. Vol. 184. P. 330–332.
 92. Kornberg R. D. Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA // *Ibid.* P. 868–871.
 93. Георгиев Г. П., Ильин Ю. В., Тихоненко А. С., Добберт Н. Н., Ананьева Л. Н. Получение и свойства хромосомных дезоксирибонуклеопротеидных комплексов // *Молекуляр. биология*. 1967. Т. 1. С. 815–829.

94. *Varshavsky A. J., Bakayev V. V., Georgiev G. P.* Heterogeneity of chromatin subunits in vitro and location of histone H1 // *Nucl. Acids Res.* 1976. Vol. 3. P. 477—492.
95. *Бакаев В. В., Варшавский А. Я., Георгиев Г. П.* Структура хромосомных дезоксирибонуклеопротенов. IX. Гетерогенность субъединиц хроматина in vitro и локализация гистона H1 // *Молекуляр. биология.* 1977. Т. 11. С. 294—302.
96. *Mirzabekov A., Shick V., Belyavsky A., Bavykin S.* Primary organization of the nucleosome core particle of chromatin: sequence of histone arrangement along DNA // *Proc. Nat. Acad. Sci. US.* 1978. Vol. 75. P. 4184—4188.
97. *Shick V., Belyavsky A., Bavykin S., Mirzabekov A.* Primary organization of the nucleosome core particles. Sequential arrangement of histones along DNA // *J. Mol. Biol.* 1980. Vol. 139. P. 491—517.
98. *Belyavsky A., Bavykin S., Gogvadze E., Mirzabekov A.* Primary organization of nucleosomes containing all five histones and DNA 175 and 165 base-pairs long // *Ibid.* P. 519—536.
99. *Мирзабеков А. Д.* Структура хроматина и других ДНК-белковых комплексов. Динамические структурные изменения в хроматине при его активации // *Общие проблемы физико-химической биологии.* М.: ВИНТИ АН СССР, 1985. С. 3—48.
100. *Richmond T. J., Finch J. T., Rushton B., Rodes D., Klug A.* Structure of nucleosome core particle at 7 Å resolution // *Nature.* 1984. Vol. 311. P. 532—537.
101. *McGhee J. D., Felsenfeld G.* Nucleosome structure // *Annu. Rev. Biochem.* 1980. Vol. 49. P. 1115—1156.
102. *Nedospasov S. A., Georgiev G. P.* Non-random cleavage of SV40 DNA in the compact minichromosome and free in solution by micrococcal nuclease // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 1980. Vol. 92. P. 532—539.
103. *Wu C.* The 5'-end of *Drosophila* heat-shock genes in chromatin are hypersensitive to DNase I // *Nature.* 1980. Vol. 286. P. 854—860.
104. *Чувпило С. А., Недоспасов С. А., Шахов А. Н., Георгиев Г. П.* Определение расположения нуклеосом вдоль ДНК методом молекулярного клонирования: картирование положений корчастий в мини-хромосоме обезьяньего вируса 40 // *Докл. АН СССР.* 1982. Т. 267. С. 1268—1272.
105. *Zachau H. G., Igo-Kemenes T.* Face to phase with nucleosomes // *Cell.* 1981. Vol. 24. P. 597—598.
106. *Zhang X. Y., Fittler F., Horz T.* Eight different highly specific nucleosome phases on α -satellite DNA in the African green monkey // *Nucl. Acids Res.* 1983. Vol. 11. P. 4287—4306.
107. *Blackburn E. H., Szostak J. W.* The molecular structure

- of centromeres and telomeres // *Annu. Rev. Biochem.* 1984. Vol. 53. P. 163—194.
108. *Ris H., Kubai D. E.* Chromosome structure // *Annu. Rev. Genet.* 1970. Vol. 4. P. 263—294.
 109. *Kiryanov G. I., Manamshyan T. A., Polyakov V., Fais D., Chentsov Y. S.* Levels of granular organization of chromatin fibres // *FEBS Lett.* 1976. Vol. 67. P. 323—327.
 110. *Thoma F., Keller T., Klug A.* Involvement of histone H1 in the organization of the nucleosome and of the salt-dependent superstructures of chromatin // *J. Cell Biol.* 1979. Vol. 83. P. 403—427.
 111. *Finch J. T., Klug A.* Solenoidal model for superstructure in chromatin // *Proc. Nat. Acad. Sci. US.* 1976. Vol. 73. P. 1897—1901.
 112. *Georgiev G. P., Nedospasov S. A., Bakayev V. V.* Supranucleosomal levels of chromatin organization // *The cell nucleus* / Ed. H. Busch. N. Y.: Acad. press, 1978. Vol. 6. P. 3—34.
 113. *Varshavsky A. J., Bakayev V. V., Nedospasov S. A., Georgiev G. P.* On the structure of eukaryotic, prokaryotic and viral chromatin // *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 1978. Vol. 42. P. 457—473.
 114. *Збарский И. Б., Дебов С. С.* Белки клеточного ядра // *Докл. АН СССР.* 1948. Т. 63. С. 795—798.
 115. *Георгиев Г. П.* Гистохимическое исследование нуклеопротеидных фракций клеточных ядер // *Биохимия.* 1958. Т. 23. С. 700—706.
 116. *Збарский И. Б., Георгиев Г. П.* Новые данные по фракционированию клеточных ядер печени крыс и химическому составу ядерных структур // *Там же.* 1959. Т. 24. С. 192—199.
 117. *Георгиев Г. П., Ченцов Ю. С.* О структуре клеточного ядра (экспериментальное электроинно-микроскопическое исследование изолированных ядер) // *Докл. АН СССР.* 1960. Т. 132. С. 199—202.
 118. *Busch H., Smetana K.* The nuclear ribonucleoprotein network and the nuclear residue // *The nucleolus* / Ed. H. Busch, K. Smetana. N. Y.: Acad. press, 1970. P. 361—379.
 119. *Gerace L., Blobel G.* The nuclear envelope lamina is reversibly depolymerized during mitosis // *Cell.* 1980. Vol. 19. P. 277—287.
 120. *Berezney R., Coffey D. S.* The nuclear protein matrix: isolation, structure and functions // *Adv. Enzyme Regul.* 1976. Vol. 14. P. 63—100.
 121. *Cook P. R., Brazell I. A.* Supercoils in human DNA // *J. Cell Sci.* 1975. Vol. 19. P. 261—279.

122. Cook P. R., Brazell I. A., Jost E. Characterization of nuclear structures containing superhelical DNA // *Ibid.* 1976. Vol. 22. P. 303—324.
123. Marsden M., Laemmli U. K. Metaphase chromosome structure: evidence for a radial loop model // *Cell.* 1979. Vol. 17. P. 849—858.
124. Howell W. M., Hsu T. S. Chromosome core structure revealed by silver staining // *Chromosoma.* 1979. Vol. 73. P. 61—66.
125. Razin S. V., Mantieva V. L., Georgiev G. P. DNA adjacent to attachment points of deoxyribonucleoprotein fibril to chromosomal axial structure is enriched in reiterated base sequences // *Nucl. Acids Res.* 1978. Vol. 5. P. 4737—4752.
126. Razin S. V., Mantieva V. L., Georgiev G. P. The similarity of DNA sequences remaining bound to scaffold upon nuclease treatment of interphase nuclei and metaphase chromosomes // *Ibid.* 1979. Vol. 7. P. 1713—1735.
127. Jackson D. A., Cook P. R. Transcription occurs at a nuclear skeleton // *EMBO J.* 1985. Vol. 4. P. 919—925.
128. Mirkovitch J., Mirault M.-E., Laemmli U. K. Organization of the high-order chromatin loop: specific DNA attachment site on nuclear scaffold // *Cell.* 1984. Vol. 39. P. 223—232.
129. Разин С. В., Ржешовска-Волни И., Моро Ж., Шерпер К. Локализация участков прикрепления ДНК к ядерному скелету в рамках домена α -глобиновых генов кур в функционально активных и функционально неактивных ядрах // *Молекуляр. биология.* 1985. Т. 19. С. 456—466.
130. Razin S. V., Chernokhvostov V. V., Yarovaya O. V., Georgiev G. P. Organization of the sites for DNA attachment to the nonhistone proteinaceous nuclear skeleton // *Progress in nonhistone protein research* / Ed. I. Bekhor. Boca Raton: CRC press, 1985. Vol. 2. P. 91—114.
131. Яровая О. В., Разин С. В. Два типа участков прикрепления ДНК к ядерному скелету в клетках асцитной карциномы Эрлиха // *Молекуляр. биология.* 1983. Т. 17. С. 303—312.
132. Cook P. R., Lang J., Hayday A., Lania L., Fried M., Chiswell D. J., Wyke J. A. Active viral genes in transformed cells lie close to the nuclear cage // *EMBO J.* 1982. Vol. 1. P. 447—452.
133. Robinson S. I., Nelkin B. D., Vogelstein B. The ovalbumin gene is associated with the nuclear matrix of chicken oviduct cells // *Cell.* 1982. Vol. 28. P. 99—106.
134. Ciejek E. M., Tsai M.-J., O'Malley B. W. Actively transcribed genes are associated with the nuclear matrix // *Nature.* 1983. Vol. 306. P. 607—609.
135. Razin S. V., Yarovaya O. V. Initiated complexes of RNA

- polymerase II are concentrated in the nuclear skeleton associated DNA // *Exp. Cell Res.* 1985. Vol. 158. P. 273—275.
136. Razin S. V., Yarovaya O. V., Georgiev G. P. Low ionic strength extraction of nuclease-treated nuclei destroys the attachment of transcriptionally active DNA to the nuclear skeleton // *Nucl. Acids Res.* 1985. Vol. 13. P. 7427—7444.
 137. Ide I., Nakane M., Anzai K., Andoh T. Super-coiled DNA folded by nonhistone proteins in cultured mammalian cells // *Nature*. 1975. Vol. 258. P. 445—447.
 138. Razin S. V., Chernokhvostov V. V., Roodyn A. V., Zbarsky I. B., Georgiev G. P. Proteins tightly bound to DNA in the regions of DNA attachment to the skeletal structures of interphase nuclei and metaphase chromosomes // *Cell*. 1981. Vol. 27. P. 65—74.
 139. Разин С. В., Брандт Д., Разина М. В., Чернохвостов В. В. Прочно связанные с ДНК белки опосредуют прикрепление к ядерному скелету транскрипционно-активной фракции ДНК // *Молекуляр. биология*. 1987. Т. 21. С. 1276—1285.
 140. Mirkovitch J., Spierer P., Laemmli U. K. Genes and loops in 320 000 base-pairs of the *Drosophila melanogaster* chromosome // *J. Mol. Biol.* 1986. Vol. 190. P. 255—258.
 141. Berrios M., Osheroff N., Fisher P. A. In situ localization of DNA topoisomerase II, a major polypeptide component of the *Drosophila* nuclear matrix fraction // *Proc. Nat. Acad. Sci. US*. 1985. Vol. 82. P. 4142—4146.
 142. Earnshaw W. A., Halligan B., Cooke C. A., Heck M. S., Liu L. F. Topoisomerase II is a structural component of mitotic chromosome scaffolds // *J. Cell Biol.* 1985. Vol. 100. P. 1706—1715.
 143. Berezney R., Coffey D. S. Nuclear matrix: association with newly synthesized DNA // *Science*. 1975. Vol. 189. P. 291—293.
 144. Jackson D. A., Cook P. R. Replication occurs at a nucleoskeleton // *EMBO J.* 1986. Vol. 5. P. 1403—1410.
 145. Van der Velden H. M. W., Willigen G., Wetzels R. H. W., Wanka F. Attachment of origins of replication to the nuclear matrix and the chromosomal scaffold // *FEBS Lett.* 1984. Vol. 171. P. 13—16.
 146. Razin S. V., Kekelidze M. G., Lukanidin E. M., Scherrer K., Georgiev G. P. Replication origins are attached to the nuclear skeleton // *Nucl. Acids Res.* 1986. Vol. 14. P. 8189—8207.
 147. Zannis-Hadjopoulos M., Persico M., Martin R. G. The remarkable instability of replication loops provides a general method for the isolation of origins of DNA replication // *Cell*. 1981. Vol. 27. P. 155—163.
 148. Pienta K. J., Coffey D. S. A structural analysis of the role

- of the nuclear matrix and DNA loops in the organization of the nucleus and chromosome // *J. Cell Sci.* 1984. Suppl. 1. P. 123—135.
149. *Beermann W.* Chromosomes and genes // *Developmental studies on giant chromosomes* / Ed. W. Beermann. N. Y.: Springer, 1972. P. 1—33.
 150. *Ashburner M., Chihara C., Meltzer P., Richards G.* Temporal control of puffing activity in polytene chromosomes // *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 1974. Vol. 38. P. 655—662.
 151. *Georgiev G. P., Ananieva L. N., Kozlov Y. V.* Stepwise removal of protein from deoxyribonucleoprotein complex and de-repression of the genome // *J. Mol. Biol.* 1966. Vol. 22. P. 365—371.
 152. *Ананьева Л. Н., Козлов Ю. В., Рысков А. П., Георгиев Г. П.* Регуляция биосинтеза информационной РНК в животной клетке. 1. Различие в характере транскрипции на хромосомном дезоксирибонуклеопропротеиде и свободной ДНК // *Молекуляр. биология.* 1968. Т. 2. С. 736—751.
 153. *Kozlov Y. V., Georgiev G. P.* Mechanism of inhibitory action of histones on DNA template activity in vitro // *Nature.* 1970. Vol. 228. P. 245—247.
 154. *Karpov V. L., Preobrazhenskaya O. V., Mirzabekov A. D.* Chromatin structure of hsp70 genes, activated by heat shock: selective removal of histones from the coding region and their absence from the 5' region // *Cell.* 1984. Vol. 36. P. 423—431.
 155. *Sternar R., Boffa L. C., Chen T. A., Allfrey V. G.* Cell cycle-dependent changes in conformation and composition of nucleosomes containing human histone gene sequences // *Nucl. Acids Res.* 1987. Vol. 15. P. 4375—4391.
 156. *Sogo J. M., Ness P. J., Widmer R. M., Parish R. W., Koller T.* Psoralen-crosslinking of DNA as a probe for structure of active chromatin // *J. Mol. Biol.* 1984. Vol. 189. P. 189—204.
 157. *De Bernardin W., Koller T., Sogo J. M.* Structure of in vivo transcribing chromatin as studied in simian virus 40 minichromosomes // *Ibid.* 1986. Vol. 191. P. 469—482.
 158. *Allfrey V. G.* Post-synthetic modification of histone structure // *Chromatin and chromosome structure* / Ed. H. J. Li, R. Eckhardt. N. Y.: Acad. press, 1977. P. 167—191.
 159. *Prior C. P., Cantor C. R., Johnson E. M., Littau V. C., Allfrey V. G.* Reversible changes in nucleosome structure and histone accessibility in transcriptionally active and inactive states of rDNA chromatin // *Cell.* 1983. Vol. 34. P. 1033—1042.
 160. *Goodwin G. H., Walker J. M., Johns E. W.* The high mobility group (HMG) nonhistone chromosomal proteins // *The cell*

- nucleus / Ed. H. Busch. N. Y.: Acad. press, 1978. Vol. 6. P. 181-219.
161. *Shick V., Belyavsky A., Mirzabekov A.* Primary organization of nucleosomes. Interaction of non-histone high mobility group proteins 14 and 17 with nucleosomes as revealed by DNA-protein cross-linking and immunoaffinity isolation // *J. Mol. Biol.* 1985. Vol. 185. P. 329—339.
 162. *Levy B. W., Connor W., Dixon G. H.* A subset of trout testis nucleosomes enriched in transcribed DNA sequences contains high mobility group proteins as major structural components // *J. Biol. Chem.* 1979. Vol. 254. P. 609—620.
 163. *Weisbrod S., Weintraub H.* Isolation of actively transcribed nucleosomes using immobilized HMG 14 and HMG 17 and an analysis of α -globin chromatin // *Cell*. 1981. Vol. 23. P. 391—400.
 164. *Bakayev V. V., Bakayeva T. G., Schmatchenko V. V., Georgiev G. P.* Non-histone proteins in mononucleosomes and subnucleosomes // *Europ. J. Biochem.* 1978. Vol. 91. P. 291-301.
 165. *Бакаев В. В., Шматченко В. В., Георгиев Г. П.* Субнуклеосомы, белки HMG и активный хроматин // *Докл. АН СССР*. 1979. Т. 245. С. 734-736.
 166. *Bakayev V. V., Schmatchenko V. V., Georgiev G. P.* Subnucleosome particles containing high-mobility group proteins HMG-E and HMG-G originate from transcriptionally active chromatin // *Nucl. Acids Res.* 1979. Vol. 7. P. 1525—1540.
 167. *Fleischmann G., Pflugfelder G., Steinmer E. K., Javaherian K., Howard G. C., Wang J. C., Elgin S. C. R.* Drosophila DNA topoisomerase I is associated with transcriptionally active regions of the genome // *Proc. Nat. Acad. Sci. US*. 1984. Vol. 81. P. 6958-6962.
 168. *Vanyshin B. F., Tkacheva S. G., Belozersky A. N.* Rare bases in animal DNA // *Nature*. 1970. Vol. 225. P. 948-949.
 169. *Doerfler W.* DNA methylation and gene activity // *Annu. Res. Biochem.* 1983. Vol. 52. P. 93—124.
 170. *Razin A., Szyf M.* DNA methylation patterns. Formation and function // *Biochim. et biophys. acta*. 1984. Vol. 782. P. 331—342.
 171. *Bird A. P., Southern E. M.* Use of restriction enzymes to study eukaryotic DNA methylation. The methylation pattern in ribosomal DNA from *Xenopus laevis* // *J. Mol. Biol.* 1978. Vol. 118. P. 27-47.
 172. *Lindahl T.* DNA methylation and control of gene expression // *Nature*. 1981. Vol. 290. P. 363-364.
 173. *Weintraub H., Groudine M.* Chromosomal subunits in active

- genes have an altered conformation // *Science*. 1976. Vol. 193. P. 848–856.
174. *Alevy M. C., Tsai M. J., O'Malley B. W.* DNAase I sensitive domain of the gene coding for the glycolytic enzyme glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase // *Biochemistry*. 1984. Vol. 23. P. 2309–2314.
 175. *Saragosti S., Moyne G., Yaniv M.* Absence of nucleosomes in a fraction of SV40 chromatin between the origin of replication and region coding for the late leader RNA // *Cell*. 1980. Vol. 20. P. 65–73.
 176. *Wu C.* The 5' ends of *Drosophila* heat shock genes in chromatin are hypersensitive to DNase I // *Nature*. 1980. Vol. 286. P. 854–860.
 177. *Elgin S. C. R.* DNAase I – hypersensitive sites in chromatin // *Ibid.* 1981. Vol. 27. P. 413–415.
 178. *Elgin S. C. R.* Anatomy of hypersensitive sites // *Nature*. 1984. Vol. 309. P. 213–214.
 179. *Shakhov A. N., Nedospasov S. A., Georgiev G. P.* Deoxyribonuclease I as a probe to sequence-specific chromatin organization: preferential cleavage in the 72 bp modulator sequence of SV40 minichromosome // *Nucl. Acids Res.* 1982. Vol. 10. P. 3951–3965.
 180. *Larsen A., Weintraub H.* An altered DNA conformation detected by S1 nuclease occurs at specific regions in active globin chromatin // *Cell*. 1982. Vol. 29. P. 609–622.
 181. *Emerson B. M., Felsenfeld G.* Specific factor conferring nuclease hypersensitivity at the 5'-end of the chicken adult β -globin gene // *Proc. Nat. Acad. Sci. US*. 1984. Vol. 81. P. 95–99.
 182. *Dynan W. S., Tjian R.* Control of eukaryotic messenger RNA synthesis by sequence-specific DNA binding proteins // *Nature*. 1985. Vol. 316. P. 774–777.
 183. *Sive H. L., Roeder R. G.* Interaction of a common factor with conserved promoter and enhancer sequences in histone H2b, immunoglobulin, and U2 small nuclear RNA (snRNA) genes // *Proc. Nat. Acad. Sci. US*. 1986. Vol. 83. P. 6382–6386.
 184. *Weinberger J., Baltimore D., Sharp P. A.* Distinct factors bind to apparently homologous sequences in the immunoglobulin heavy chain enhancer // *Nature*. 1986. Vol. 322. P. 846–848.
 185. *Brown D. D.* The role of stable complexes that repress and activate eukaryotic genes // *Cell*. 1984. Vol. 37. P. 359–365.
 186. *Singh H., Sen R., Baltimore D., Sharp P.* A nuclear factor that binds to a conserved sequence motif in transcriptional

- control elements of immunoglobulin genes // *Nature*. 1986. Vol. 319. P. 154—158.
187. Wang J. DNA topoisomerases // *Annu. Rev. Biochem.* 1985. Vol. 54. P. 665—699.
 188. Germond J. E., Hirt B., Oudet P., Gross-Bellard M., Chambon P. Folding of the DNA double-helix in chromatin-like structures from simian virus 40 // *Proc. Nat. Acad. Sci. US*. 1975. Vol. 72. P. 1843—1847.
 189. Luchnik A. N., Bakayev V. V., Zbarsky I. B., Georgiev G. P. Elastic torsional strain in DNA within a fraction of SV40 minichromosomes: relation to transcriptionally active chromatin // *EMBO J.* 1982. Vol. 1. P. 1353—1358.
 190. Ryoji M., Worcel A. Chromatin assembly in *Xenopus* oocytes: in vivo studies // *Cell*. 1984. Vol. 37. P. 21—32.
 191. Ryoji M., Worcel A. Structure of the two distinct types of minichromosomes that are assembled on DNA injected in *Xenopus* oocytes // *Ibid.* 1985. Vol. 40. P. 923—932.
 192. Luchnik A. N., Bakayev V. V., Yugai A. A., Zbarsky I. B., Georgiev G. P. DNase I hypersensitive minichromosomes of SV40 possess an elastic torsional strain in DNA // *Nucl. Acids Res.* 1985. Vol. 13. P. 1135—1149.
 193. Bakayev V. V., Yugai A. A., Luchnik A. N. Effect of X-ray induced DNA damage of DNase I hypersensitivity of SV40 chromatin: relation to elastic torsional strain in DNA // *Ibid.* P. 7079—7094.
 194. Georgiev G. P., Varshavsky A. J., Ryskov A. P., Church R. B. On the structural organization of transcriptional unit in animal chromosomes // *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 1974. Vol. 38. P. 869—884.
 195. Harland R. M., Weintraub H., McKnight S. L. Transcription of DNA injected into *Xenopus* oocytes is influenced by template topology // *Nature*. 1983. Vol. 302. P. 38—43.
 196. Weintraub H., Cheng P. F., Conrad K. Expression of transferred DNA depends on DNA topology // *Cell*. 1986. Vol. 46. P. 115—122.
 197. Лучник А. Н., Дубинина Е. Н., Збарский И. Б., Георгиев Г. П. Подавление транскрипции в клетках млекопитающих рентгеновским облучением при нарушении топологической замкнутости сверхспиральных петель ДНК // *Докл. АН СССР*. 1987. Т. 294. С. 188—191.
 198. Courey A. J., Plon S. E., Wang J. C. The use of psoralen-modified DNA to probe the mechanism of enhancer action // *Cell*. 1986. Vol. 45. P. 567—574.
 199. Plon S. E., Wang J. C. Transcription of the human β -globin gene is stimulated by an SV40 enhancer to which it is physi-

- cally linked but topologically uncoupled // *Ibid.* P. 575—580.
200. *Ptaschne M.* Gene regulation by proteins acting nearby and at a distance // *Nature.* 1986. Vol. 322. P. 697—701.
 201. *Luchnik A. N., Bakayev V. V., Glaser V. M.* DNA supercoiling changes during cellular differentiation and activation of chromatin transcription // *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 1983. Vol. 47. P. 793—801.
 202. *Luchnik A. N.* Evidence for a novel conformational transition in superhelical DNA // *J. Biol. Phys.* 1965. Vol. 13. P. 48—54.
 203. *Klug A., Rhodes D.* An underlying repeat in some transcriptional control sequences corresponding to half a double helical turn of DNA // *Cell.* 1986. Vol. 46. P. 123—132.
 204. *Спирин А. С., Белицина Н. В., Айтхожин М. А.* Информационные РНК в раннем эмбриогенезе // *Журн. общ. биологии.* 1964. Т. 25. С. 321—338.
 205. *Самарина О. П., Асриян И. С., Георгиев Г. П.* Выделение ядерных нуклеопротеидов, содержащих информационную РНК // *Докл. АН СССР.* 1965. Т. 163. С. 1510—1513.
 206. *Samarina O. P., Krichevskaya A. A., Georgiev G. P.* Nuclear ribonucleoproteins containing messenger RNA // *Nature.* 1966. Vol. 210. P. 1319—1322.
 207. *Самарина О. П., Кричевская А. А., Молнар Я., Брусков В. И., Георгиев Г. П.* Ядерные рибонуклеопротеиды, содержащие информационную РНК. 1. Выделение и некоторые свойства // *Молекуляр. биология.* 1967. Т. 1. С. 129—141.
 208. *Самарина О. П., Кричевская А. А., Георгиев Г. П.* Ядерные рибонуклеопротеиды, содержащие информационную РНК. 2. Взаимодействие со свободной мРНК и с рибосомами // *Там же.* С. 565—575.
 209. *Самарина О. П., Молнар Я., Кричевская А. А., Луканидин Е. М., Брусков В. И., Георгиев Г. П.* Ядерные рибонуклеопротеиды, содержащие информационную РНК. 3. Обратимая диссоциация частиц на РНК и белок и их последующая реконструкция // *Там же.* С. 648—656.
 210. *Samarina O. P., Molnar J., Lukanidin E. M., Bruskov V. I., Krichevskaya A. A., Georgiev G. P.* Reversible dissociation of nuclear ribonucleoprotein particles containing mRNA into RNA and protein // *J. Mol. Biol.* 1967. Vol. 27. P. 187—191.
 211. *Lawford G. R., Sadowski P., Schachter H.* Use of a ribonuclease inhibitor from rat liver supernatant fraction in the preparation of polyribosome-like particles from isolated rat liver nuclei // *Ibid.* Vol. 23. P. 81—87.
 212. *Samarina O. P., Lukanidin E. M., Molnar J., Georgiev G. P.* Structural organization of nuclear complexes containing DNA-like RNA // *Ibid.* 1968. Vol. 33. P. 251—263.

213. *Krichevskaya A. A., Georgiev G. P.* Further studies on the protein moiety in nuclear DNA-like RNA containing complexes // *Biochim. et biophys. acta.* 1969. Vol. 194. P. 619–621.
214. *Martin T. E., Billings P., Levey A., Ozarsian S., Quinlan I., Swift H., Urbas L.* Some properties of RNA: protein complexes from the nucleus of eukaryotic cells // *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 1974. Vol. 38. P. 921–932.
215. *Georgiev G. P., Samarina O. P.* D-RNA containing ribonucleo-protein particles // *Adv. Cell Biol.* 1971. Vol. 2. P. 47–100.
216. *Beyer A. L., Christensen M. E., Walker B. M., Le Stourgeon W. M.* Identification and characterization of the packaging proteins of core 40S hn RNP particles // *Cell.* 1977. Vol. 11. P. 127–138.
217. *Economidis I. V., Pederson T.* Structure of nuclear ribonucleo-protein: heterogeneous nuclear RNA is complexed with a major sextet of proteins in vivo // *Proc. Nat. Acad. Sci. US.* 1983. Vol. 80. P. 1599–1602.
218. *Cruz-Alvarez M., Szer W., Pellicer A.* Cloning of cDNA sequences for an Artencia salina hnRNP protein: evidence for conservation through evolution // *Nucl. Acids Res.* 1985. Vol. 13. P. 3917–3930.
219. *Nakagawa T. Y., Swanson M. S., Wold B. J., Dreyfuss G.* Molecular cloning of cDNA for the nuclear ribonucleoprotein particle C-proteins: a conserved gene family // *Proc. Nat. Acad. Sci. US.* 1986. Vol. 83. P. 2007–2011.
220. *Chung C. Y., Wooley J.* Set of novel, conserved proteins fold pre-messenger RNA into ribonucleosomes // *Proteins.* 1986. Vol. 1. P. 195–210.
221. *Riva S., Marandi C., Tsoulfus P., Pandolfo M., Biamonti G., Merrill B., Williams K. R., Multhany G., Bayreuther K., Werr H., Henrich R., Schafer K. P.* Mammalian single-stranded DNA-binding protein is derived from the hnRNP core protein A1 // *EMBO J.* 1986. Vol. 5. P. 2267–2274.
222. *Pandolfo M., Valenti O., Biamonti G., Morandi C., Riva S.* Single-stranded DNA binding proteins derive from hnRNP proteins by proteolysis in mammalian cells // *Nucl. Acids Res.* 1985. Vol. 13. P. 6577–6590.
223. *Lukanidin E. M., Aitkhozhina N. A., Kulguskin V. V., Georgiev G. P.* The isolation of informofers free from dRNA // *FEBS Lett.* 1971. Vol. 2. P. 101–104.
224. *Lukanidin E. M., Zalmanzon E. S., Komaromi L., Samarina O. P., Georgiev G. P.* The structure and function of informofers // *Nature. New Biol.* 1972. Vol. 238. P. 193–197.
225. *Kulguskin V. V., Lukanidin E. M., Georgiev G. P.* Free infor-

- mothers and reconstitution of 30S RNP // Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 1978. Vol. 42. P. 911–913.
226. *Martin T. E., Billings P. B., Pullman J. M., Stevens B. J., Kinniburgh A. J.* Substructures of nuclear ribonucleoprotein complexes // *Ibid.* P. 899–909.
 227. *Kulguskin V. V., Krichevskaya A. A., Lukanidin E. M., Georgiev G. P.* Studies on dissociation and reconstitution of nuclear 30S ribonucleoprotein particles containing pre-mRNA // *Biochim. et biophys. acta.* 1980. Vol. 609. P. 410–424.
 228. *Prosvirnin V., Ruzidic S., Samarina O. P.* Cross-linked informofers // *Nucl. Acids Res.* 1979. Vol. 7. P. 1649–1661.
 229. *Samarina O. P., Krichevskaya A. A.* Nuclear 30S particles // *The cell Nucleus.* / Ed. H. Busch. N. Y.: Acad. press, 1981. Vol. 9. P. 1–48.
 230. *Thomas J. O., Glowack S. K., Szer W.* Structure of complexes between a major protein of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein particles and polyribonucleotides // *J. Mol. Biol.* 1983. Vol. 171. P. 439–455.
 231. *Мантјева В. Л., Авакян Э. Р., Георгиев Г. П.* Ядерные рибонуклеопротеиды, содержащие информационную РНК. 6. Классы ядерной Д-РНК, связанные с информоферами // *Молекуляр. биология.* 1969. Т. 3. С. 545–553.
 232. *Noll F., Lukanidin E. M.* Species specificity of informatin // *Mol. Biol. Rep.* 1977. Vol. 3. P. 339–345.
 233. *Zalmanzon E. S., Mikhailova L. N., Lukanidin E. M.* The nature of nuclear ribonucleoprotein particles containing virus-specific RNA // *Ibid.* 1974. Vol. 1.P. 269–273.
 234. *Самарина О. П., Холоденко Л. А., Айтхожина Н. А.* Ядерные РНП, содержащие информационную РНК. 8. Образование в бесклеточной системе // *Молекуляр. биология.* 1972. Т. 6. С. 712–720.
 235. *Economidis I. V., Pederson T.* In vitro assembly of a pre-messenger ribonucleoprotein // *Proc. Nat. Acad. Sci. US.* 1983. Vol. 80. P. 4296–4300.
 236. *Lukanidin E. M., Georgiev G. P., Williamson R.* A comparative study of the protein components of nuclear and polysomal messenger ribonucleoprotein // *FEBS Lett.* 1971. Vol. 19. P. 152–156.
 237. *Lukanidin E. M., Noll F.* Immunochemical assay for informatin in cytoplasmic polysomes // *Mol. Biol. Rep.* 1977. Vol. 3. P. 347–351.
 238. *Jones R. E., Okamura C. S., Martin T. E.* Immunofluorescent localization of the proteins of nuclear ribonucleoprotein complexes // *J. Cell Biol.* 1980. Vol. 86. P. 235–243.
 239. *Skoglund U., Andersson K., Strandberg B., Daneholt B.* Tree-

- dimensional structure of a specific pre-messenger RNP particles established by electron microscope tomography // *Nature*. 1986. Vol. 319. P. 560—564.
240. *Samarina O. P., Aitkhozhina N. A., Besson J.* Poly A blocks in the nuclear ribonucleoprotein complexes containing pre-mRNA // *Mol. Biol. Rep.* 1973. Vol. 1. P. 193—199.
241. *Molnar J., Samarina O. P.* Protein composition of nuclear 14S ribonucleoprotein particles containing poly(A) // *Ibid.* 1975. Vol. 2. P. 1—10.
242. *Lerner M. R., Boyle J. A., Mount S. M., Wolin S. L., Steitz J. A.* Are snRNPs involved in splicing? // *Nature*. 1980. Vol. 283. P. 220—224.
243. *Mount S. M., Peterson I., Hinterberger M., Karmas A., Steitz J. A.* The U1 small nuclear RNA-protein complex selectively binds a 5'splice site in vitro // *Cell*. 1983. Vol. 33. P. 509—518.
244. *Keller W.* The RNA lariat: a new ring to the splicing of mRNA precursors // *Ibid.* 1984. Vol. 39. P. 423—425.
245. *Black D. L., Chabot B., Steitz J. A.* U2 as well as U1 small nuclear ribonucleoproteins are involved in premessenger RNA splicing // *Ibid.* 1985. Vol. 42. P. 737—750.
246. *Krainer A. R., Maniatis T.* Multiple factors including the small ribonucleoproteins U1 and U2 are necessary for pre-mRNA splicing in vitro // *Ibid.* P. 725—736.
247. *Mayrand S. H., Pedersen N., Pedersen T.* Identification of proteins that bind tightly to pre-mRNA during in vitro splicing // *Proc. Nat. Acad. Sci. US*. 1986. Vol. 83. P. 3718—3722.
248. *Kruger K., Grabowsky P. J., Zaig A. J., Sands J., Gottschling D. E., Cech T. R.* Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence in tetrahymena // *Cell*. 1982. Vol. 31. P. 147—157.
249. *Cech T. R.* Self-splicing RNA: implications for evolution // *Intern. Rev. Cytol.* 1985. Vol. 93. P. 3—22.
250. *Cech T. R.* The generality of self-splicing RNA: relation to nuclear mRNA splicing // *Cell*. 1986. Vol. 44. P. 207—210.
251. *Gick P., Krämer A., Keller W., Birnstiel M.* Generation of histone mRNA 3'-ends by endonucleolytic cleavage of the pre-mRNA in a snRNP-dependent in vitro reaction // *EMBO J.* 1986. Vol. 5. P. 1314—1326.
252. *Hashimoto C., Steitz J. A.* A small nuclear ribonucleoprotein associated with AAUAAA polyadenylation signal in vitro // *Cell*. 1986. Vol. 45. P. 581—591.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие	3
Глава первая	
Введение в молекулярную биологию гена	5
1.1. Начало молекулярной биологии гена	5
1.2. ^{1*} Открытие ядерной дРНК в эукариотических клетках	8
1.3. ^{1*} Характеристика ядерной дРНК (гетерогенной ядерной РНК): дРНК как предшественник мРНК цитоплазмы	15
1.4. ДНК эукариот содержит повторяющиеся последовательности	20
1.5. ^{1*} Концепции организации эукариотического гена	24
1.6. Другие особенности организации и работы генетического аппарата у эукариот	25
1.7. Методическая революция 70-х годов	27
1.8. ^{1*} Первые результаты технической революции в молекулярной биологии гена	33
Глава вторая	
Строение эукариотических генов	35
2.1. Экзоны и интроны	35
2.2. Организация 5'- и 3'-концов в первичном транскрипте и мРНК	57
2.3. Регуляторные последовательности эукариотического генома	62
2.4. Уникальные гены и генные семейства	77
2.5. Резюме	81

Глава третья

Организация генов в хромосоме: структура хроматина .	83
3.1. Составные компоненты хроматина	83
3.2. Первый уровень организации хроматина — 100 Å-нуклеосомная фибрилла	85
3.3. ^{1*2*} Второй уровень организации хроматина: соле- ноид или нуклеомер	100
3.4. ^{1*} Третий уровень организации хроматина: петли .	104
3.5. Четвертый уровень структуры хроматина — укладывание в метафазную хромосому	139
3.6. Резюме	140

Глава четвертая

Регуляция активности генов на хромосомном уровне . .	141
4.1. Активация генов идет через деконденсацию хроматина	141
4.2. Изменения в химическом составе хроматина при его активации	143
4.3. ^{2*} Характерные свойства транскрипционно актив- ного хроматина: чувствительность и гиперчувст- вительность к ДНКазе I и свободная от нуклео- сом зона	163
4.4. Регуляторные белки, связывающиеся с энхансе- рами и другими контролирующими элементами генов	167
4.5. ^{1*} Упругие торзионные напряжения в ДНК в со- ставе активного хроматина и их возможная роль в регуляции транскрипции	172
4.6. О механизме действия энхансеров и сайленсе- ров	191
4.7. Резюме	194

Глава пятая

Работа гена и его регуляция на уровне ядерной РНК: ядерные рибонуклеопротеидные (РНП) частицы — субстрат процессинга	195
5.1. ^{1*} Открытие ядерных РНП-частиц, содержащих про-мРНК (гяРНК)	195
5.2. ^{1*} Структурная организация 30S-частиц	199

5.3. ^{1*}	Расшифровка структуры нативных гяРНП . . .	200
5.4. ^{1*}	Информатины	206
5.5. ^{1*}	Информоферы	209
5.6. ^{1*}	Информоферный цикл	215
5.7.	Высшие уровни упаковки ядерных РНП-частиц и их взаимодействие с ядерным скелетом . . .	218
5.8.	Другие классы ядерных РНП	220
5.9.	Резюме	223

Глава шестая

Работа гена и его регуляция на уровне ядерной РНК: процессинг про-мРНК и созревание мРНК		224
6.1.	Сплайсинг	224
6.2.	Другие процессы созревания мРНК и роль мРНК	229
6.3.	Резюме	230
Заключение		231
Список литературы		234

Научное издание

Георгиев Георгий Павлович

**ГЕНЫ
ВЫСШИХ ОРГАНИЗМОВ
И ИХ ЭКСПРЕССИЯ**

Утверждено к печати
редколлегией серии «Академические чтения»

Редактор О. Л. Оболенская
Художественный редактор В. В. Алексеев
Технические редакторы Т. В. Калинина, М. Ю. Соловьева
Корректоры Л. А. Лсбедева, Қ. П. Лосева

ИБ № 35549

Сдано в набор 22.12.88
Подписано к печати 18.05.89
Т-07576. Формат 70×100¹/₃₂
Бумага офсетная № 1
Гарнитура литературная
Печать офсетная
Усл. печ. л. 10.32. Усл. кр. отт. 10.56. Уч.-изд. л. 12.2
Тираж 18000 экз. Тип. зак. 1118
Цена 80 коп.

Ордена Трудового Красного Знамени
издательство «Наука»
117864, ГСП-7. Москва. В-485,
Профсоюзная ул., 90

Ордена Трудового Красного Знамени
Первая типография издательства «Наука»
199034, Ленинград, В-34, 9 линия, 12

80 коп.



Академические чтения



Академик Георгий Павлович Георгиев является крупнейшим ученым в области молекулярной биологии и генетики, лауреат Ленинской и Государственной премий.